



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ALERGIA À PICADA DE HIMENÓPTEROS EM CÃES.

HUGO MIGUEL LINO PEREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Ana Mafalda Gonçalves

Xavier Felix Lourenço

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves

Gil

ORIENTADORA

Doutora Ana Mafalda Gonçalves

Xavier Felix Lourenço

CO-ORIENTADOR

Dr. Mário Morais de Almeida

2016
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ALERGIA À PICADA DE HIMENÓPTEROS EM CÃES.

HUGO MIGUEL LINO PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Ana Mafalda Gonçalves

Xavier Felix Lourenço

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves

Gil

ORIENTADORA

Doutora Ana Mafalda Gonçalves

Xavier Felix Lourenço

CO-ORIENTADOR

Dr. Mário Morais de Almeida

2016
LISBOA

To “Bee” or not to “Bee”

Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha orientadora, Professora Ana Mafalda Lourenço que, para além de tutora e professora, foi uma querida amiga. Obrigado pela dedicação, pelo carinho e pelo exemplo de rigor no seu exercício profissional. Apesar de ter sido um caminho difícil de percorrer, mostrou-me que tudo é possível, desde que se acredite e trabalhe com afinco. Será para sempre um exemplo para mim, como veterinária e como dermatologista. Vou com toda a certeza seguir os conselhos que me deixou ao longo desta fase do meu percurso.

Ao meu co-orientador, Dr. Mário Morais de Almeida, por toda a simpatia, amizade e disponibilidade e ainda por ter permitido o acesso a recursos necessários à realização deste trabalho. Sem si, este trabalho não teria sido possível. Obrigado.

A toda a equipa do SOSVet, em particular à Dr^a. Ana Clotilde Alves, por me ter aceitado e por ter sido uma excelente professora, sempre atenciosa, carinhosa e disposta a ajudar, durante todo o tempo do estágio. Às Dr^{as}. Susana, Teresa, Sara, Enfermeira Sónia e ao Dr. Rafael por tudo o que me ensinaram, pela simpatia, amizade e carinho com que me receberam e por toda a ajuda que me deram para enfrentar as dificuldades durante o estágio. A todos vocês, muito obrigado.

A toda la gente que encontré en Argentina, doctores y todos los amigos que hice, y en especial al Dr. Pablo Manzuc por todas las enseñanzas y por la oportunidad increíble de poder aprender con el mejor. Queda la amistad y el cariño que tengo por ti y gracias por haber hecho la Argentina quedar en mi corazón. Al Dr. Pablo del Mestre, por la ayuda en casos dermatológicos difíciles, por la amabilidad de recibirme, por la amistad y por la inmensa ayuda con las fotos de este trabajo. Al los dos muchas gracias.

A toda a equipa do Hospital escolar FMV, pelo apoio e pela possibilidade de acesso aos casos clínicos envolvidos neste trabalho. À Professora Berta São Braz e à Eng. Adriana Belas, por toda a ajuda, pelos bons ensinamentos, disponibilidade e rigor na realização do trabalho de laboratório e ainda ao Professor José Henrique Duarte Correia que, sempre que precisei, me ajudou nas questões que lhe colocava.

À BIAL Aristegui, na pessoa do Dr. Luís Silva, pela disponibilização de recursos essenciais para este estudo e à DGAV, pelos dados gentilmente fornecidos neste trabalho.

Ao Professor Telmo Nunes, por ter sido tão paciente e por toda a ajuda em torno da estatística.

Ao meu pai e mãe, por estarem sempre presentes durante todo o percurso, pelo amor, pela educação, pelo apoio incondicional e força que sempre me deram. Adoro-vos! Muito obrigado por fazerem de mim quem sou.

À mãe da Rita, pelas simpatia e horas indeterminadas em que estivemos a rever a tese, adaptando-a a um “novo” português.

A todos os meus amigos, da “velha guarda” e da faculdade, porque a vossa amizade é um pilar importante na concretização dos meus sonhos. Continuem a fazer parte da minha vida.

Em especial à Rita Pereira, que me apoia incondicionalmente, que esteve sempre comigo nos bons e maus momentos para celebrar ou ajudar, que me motiva e porque torna tudo mais fácil com amor. A ti, a minha eterna gratidão. Ainda um agradecimento especial para a Jimmy e para o “nosso” fiel companheiro Dexie que olha sempre por nós e que me lembram a razão de querer ser um bom veterinário.

Por fim, a todos os doentes e seus cuidadores que aceitaram participar neste projeto e o tornaram possível, o meu sincero muito obrigado. É graças a todos vocês que a ciência avança.

Resumo

Pereira, H.M.L. 2016. ALERGIA À PICADA DE HIMENÓPTEROS EM CÃES.

Todos os anos, uma quantidade significativa de cães tem manifestações alérgicas após ser vítima de picada por himenópteros, não sendo conhecida a prevalência desta alergia em Portugal. Adicionalmente, em medicina veterinária, existem poucos estudos sobre os métodos de diagnóstico disponíveis para estudar a alergia aos himenópteros, incluindo a sua eficácia e segurança. Os testes intradérmicos (IDs) são, em medicina humana, meios de diagnóstico seguros de elevada sensibilidade, sendo os resultados apoiados por testes *in vitro*.

Na primeira fase do trabalho procurou-se recolher informações sobre a casuística desta alergia em Portugal. A partir de inquéritos a centros veterinários do país, concluiu-se que a maioria dos casos ocorre na primavera-verão, que o agente envolvido na picada geralmente não é identificado, que os adultos jovens estão mais predispostos, sendo comumente picados na face e que as picadas acontecem maioritariamente em animais de exterior, sendo que, não parecem existir raças mais predispostas. Concluiu-se ainda que o angioedema é o sinal clínico de maior ocorrência, que o tratamento mais usado pelos clínicos são os glucocorticóides e que os donos não sabem como prevenir o problema. Neste estudo não se encontrou relação entre o número de casos de cães alérgicos picados e as zonas de maior densidade populacional de *Apis mellífera* ($p>0,05$).

A segunda fase deste trabalho incidiu na realização de testes IDs com três venenos específicos de himenópteros (*Apis mellífera*, *Vespula spp.* e *Polistes spp.*) para avaliar a rentabilidade diagnóstica e a segurança. O protocolo utilizado foi baseado nos protocolos sequencial e simultâneo descritos em medicina humana e, tanto quanto sabemos, este protocolo foi usado pela primeira vez em cães. Os resultados apresentados revelam que os IDs podem ser realizados com segurança e que são eficazes no sentido de identificar hipersensibilidade à picada de himenópteros. O estudo revela também que, além do agente suspeito, alguns dos pacientes tendem a apresentar dupla positividade nos IDs, ficando por saber qual a influência das reações cruzadas nestes resultados. Os animais responderam positivamente a concentrações entre 0,01 a 1 µg/ml. O grupo controlo não apresentou qualquer tipo de reatividade a essas concentrações. Estudos futuros já planeados, com recurso a testes serológicos, poderão permitir estudar a existência de reatividade cruzada.

Este estudo abre novas portas no diagnóstico de cães alérgicos a venenos de himenópteros, permitindo desenhar novos tratamentos, nomeadamente com recurso à imunoterapia específica.

Palavras-chave: Himenópteros, alergénios, *Apis mellífera*, *Vespula spp.*, *Polistes spp.*, testes intradérmicos.

Abstract

Pereira, H.M.L. 2016. HYMENOPTERA STING ALLERGY IN DOGS.

Although its prevalence is still not known in Portugal, every year dogs are stung by hymenoptera and show allergic reactions. To our knowledge, there are only a couple of studies regarding hymenoptera allergy and its diagnosis in dogs. In human patients, the use of intradermal tests is both safe and sensitive and results are sometimes supported by *in vitro* tests.

In this work, firstly, we performed surveys in veterinary centres in order to gather as much information as possible about this allergy in Portugal. We have concluded that most hymenoptera stings happen in the spring/summer season; that usually the owners don't recognise the insect which causes the allergy; that young adult dogs living outside are more often stung and that this occurs mainly on the face. It also seems there is no breed predisposition for this allergy. We also found that angioedema is the most reported clinical sign and that corticosteroids are often used to treat this allergy. Interestingly, owners are not given any instructions on how to prevent the following sting.

The regions with higher density of *Apis mellifera* in Portugal did not relate with an increase number of dogs stung ($p>0,05$).

In the second part of this work, intradermal tests using three distinct venoms (*Apis mellifera*, *Vespula spp.* and *Polistes spp.*) were performed to evaluate both the diagnostic yield and test safety. As far as we know, the protocol used in this study was adapted from human sequential and simultaneous protocols and it was, for the first time, used in dogs. The results revealed that intradermal testing is both efficient and safe to use in dogs and helpful in the diagnosis of hymenoptera stings in allergic animals. The study also reveals that although dogs did react to the main sting suspect, some of them also tend to be positive to other venoms. It's yet to be evaluated, in dogs, what kind of role cross-reactivity plays in this type of tests. Dogs have positively reacted to 0,01 a 1 µg/ml of venom concentration intervals. The control group hasn't shown any reaction to these concentrations. Further investigations in dogs with serological testing will allow studying the presence and nature of cross-reactivity. It is hoped that our research in hymenoptera allergy in dogs will improve the understanding of the disease and allows developments in both diagnosis and management options, particularly the use of specific venom immunotherapy as prevention.

Key Words: Hymenoptera, allergens, *Apis mellifera*, *Vespula spp.*, *Polistes spp.*, intradermal tests.

Índice

I - Atividades desenvolvidas na área clínica	1
II - Revisão Bibliográfica	4
1. Introdução	4
2. Epidemiologia e Incidência.....	4
3. Fatores de risco	6
4. Entomologia dos himenópteros.....	9
5. Alergénios dos venenos	12
5.1. Principais alergénios	12
5.2. Reações cruzadas	13
5.3. Dose letal	14
6. Reações alérgicas ao veneno dos himenópteros	15
6.1. Introdução teórica	15
6.2. Sinais clínicos	16
7. Diagnósticos diferenciais	21
8. Diagnóstico de alergia ao veneno dos himenópteros	22
8.1. Anamnese.....	22
8.2. Provas cutâneas.....	22
8.3. Testes <i>in vitro</i>	24
8.4. Erros no diagnóstico	27
9. Maneio	29
9.1. Principais tratamentos.....	29
9.2. Prevenção.....	30
9.3. Imunoterapia	31
9.4. Prognóstico	31
10. Imunoterapia	32
10.1. Mecanismos de ação	32
10.2. Indicações para imunoterapia	33
10.3. Protocolos de imunoterapia	33
10.4. Efeitos da imunoterapia	35
10.5. Outros protocolos.....	35
10.6. Aspectos práticos da imunoterapia	37
11. Investigações futuras.....	37

III - Alergia à picada de Himenópteros	39
1. Fase I - Alergia dos cães à picada por himenópteros em Portugal	39
1.1. Objetivo da fase I.....	39
1.2. Materiais e Métodos.....	39
1.3. Resultados	41
1.4. Discussão	49
2. Fase II - Alergia dos cães à picada por himenópteros	56
2.1. Objetivos da fase II	56
2.2. Materiais e métodos	56
2.3. Resultados	60
2.4. Discussão	66
3. Conclusões	71
Bibliografia.....	73
Anexo I - Inquérito às clínicas veterinárias.....	85
Anexo II - Distribuição do número de apiários, colmeias, cortiços e colónias por distrito/ concelho (resumo dos dados disponibilizados pela DGAV)	89
Anexo III - Termo de aceitação para participação no estudo	93
Anexo IV - Inquérito aos proprietários de cães picados por himenópteros.....	94

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação taxonómica dos insetos himenópteros mais relevantes desde o ponto da alergia na Península Ibérica	11
Tabela 2. Alergénios do veneno de himenópteros.....	13
Tabela 3. Classificação do grau de reação sistémica alérgica em pessoas	19
Tabela 4. Sinais clínicos das picadas de insetos em cães	20
Tabela 5. Protocolo imunoterapia para veneno de himenópteros	34
Tabela 6. Testes de normalidade da variável densidade.....	48
Tabela 7. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.....	48
Tabela 8. Características dos animais alérgicos à picada incluídos no estudo	61
Tabela 9. Distribuição por género dos animais alérgicos à picada.....	61
Tabela 10. Distribuição por raça (número de pacientes)	61
Tabela 11. Distribuição etária dos animais alérgicos aquando a picada	62
Tabela 12. Características dos animais controlo incluídos no estudo	62
Tabela 13. Resultados dos inquéritos aos donos dos pacientes alérgicos aos himenópteros deste estudo.....	63
Tabela 14. Alergénios e respetivas concentrações avaliadas nos testes intradérmicos	65

Lista de Figuras

Figura 1. Abelha (<i>Apis mellífera</i>)	9
Figura 2. Zangão (<i>Bombus terrestris</i>)	9
Figura 3. Vespa-papel (<i>P. dominulus</i>)	10
Figura 4. Vespa (<i>V. crabro</i>) (original)	10
Figura 5. Exemplos de himenópteros em Portugal	11
Figura 6. Angioedema da cabeça	17
Figura 7. Reações urticariformes	18
Figura 8. Distribuição das clínicas contactadas em Portugal continental	41
Figura 9. Gráfico da estação do ano mais frequente	42
Figura 10. Gráfico sobre agente envolvido	42
Figura 11. Gráfico sobre idade mais frequente	42
Figura 12. Gráfico sobre estilo de vida mais frequente	42
Figura 13. Gráfico sobre região mais frequente das picadas	43
Figura 14. Gráfico sobre sintomas mais frequentes	43
Figura 15. Gráfico dos sintomas que já surgiram nos casos de alergia por picada de himenópteros	44
Figura 16. Gráfico sobre tratamentos mais utilizados	44
Figura 17. Gráfico sobre conselhos para prevenção	45
Figura 18. Gráfico sobre predisposição de raças	45
Figura 19. Gráfico sobre apicultores com cães e alergia aos himenópteros	45
Figura 20. Gráfico sobre apicultores na região	45
Figura 21. Gráfico dos números de casos por ano em Portugal continental	46
Figura 22. Distribuição do número de casos por ano em Portugal continental	46
Figura 23. Mapa da densidade (número de colónias/km ²) dos concelhos	48
Figura 24. Esquema de preparação das soluções a utilizar nos testes intradérmicos	58
Figura 25. Esquema simplificado do procedimento e mecanismo de ação dos testes intradérmicos ...	60
Figura 26. Testes intradérmicos positivos para veneno de himenópteros	64

Lista de Abreviaturas e Siglas

a.C.	Antes de Cristo	PLA1	Fosfolipase A1
IV	Intravenosa	PLA2	Fosfolipase A2
IM	Intramuscular	IL-3	Interleucina 3
SC	Subcutânea	IL-4	Interleucina 4
PO	<i>Per os</i>	IL-5	Interleucina 5
IgE	Imunoglobulina E	IL-6	Interleucina 6
IgG	Imunoglobulina G	IL-8	Interleucina 8
IgM	Imunoglobulina M	IL-9	Interleucina 9
Th1	<i>T-Helper 1</i>	IL-10	Interleucina 10
Th2	<i>T-Helper 2</i>	IL-12	Interleucina 12
IFN- γ	Interferão Gama	IL-13	Interleucina 13
TNF- α	Fator de necrose tumoral	IL-18	Interleucina 18
IDs	Testes Intradérmicos	IL-33	Interleucina 33
DP	Dupla Positividade		
CCDs	<i>Cross-reactive carbohydrate determinants/</i> Determinantes reativos carboidratados		
BSACI	<i>British Society for Allergy and Clinical Immunology</i>		
IVIS	Serviço de Informação Internacional Veterinária		
CID	Coagulação intravascular disseminada		
RAST	<i>Radio Allergo Sorbent Test</i>		
HRT	<i>Histamin release test/</i> Teste libertação de histamina		
BAT	<i>Basophil activation test/</i> Teste activação de basófilos		
CAST	<i>Cellular antigen stimulation test /</i> Teste de estimulação antigénica celular		
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>		
IECAs	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina		
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária		
ITV	Imunoterapia específica com veneno de himenópteros		
CPARA	Catálogo Português de Alergias e Reações Adversas		

Parte I

Atividades desenvolvidas na área clínica

Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito do estágio curricular incluído nos pressupostos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), e no estágio extracurricular realizado no Hospital SOSVet de Almada. O primeiro decorreu de 15 de setembro de 2014 a 16 de janeiro de 2015 e posteriormente de 1 de maio a 1 de setembro de 2015; o segundo decorreu de 15 de setembro de 2014 a 16 de janeiro de 2015.

O estágio no Hospital Escolar FMV-UL foi realizado apenas na área da Dermatologia, sob a orientação da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, orientadora também desta dissertação de mestrado.

Neste serviço foi possível assistir a consultas, realizar anamnese, exames de estado geral e diversos outros procedimentos, tais como preparação e administração de fármacos injetáveis, colocação de cateteres, efetuar sedações, colheita de sangue, citologias cutâneas e auriculares, raspagens cutâneas e punções com agulha fina, biópsias cutâneas, videoscopias e limpezas auriculares, realizar testes intradérmicos e consequente imunoterapia alérgico-específica, entre outros procedimentos de diagnóstico e tratamento. Além da aprendizagem adquirida através dos múltiplos casos clínicos que surgiram, suportados pela leitura de artigos científicos, nomeadamente para responder a determinados casos especiais, este estágio foi uma oportunidade de crescimento a nível pessoal e de desenvolvimento das capacidades de trabalho conjunto com outros colegas veterinários, indispensável para o bom funcionamento do local de trabalho.

O estágio do Hospital Veterinário SOSVet foi realizado sob orientação da Dra. Ana Clotilde Alves e abordou as áreas de Clínica e Cirurgia de Animais de Companhia, incluindo a participação em atividades no âmbito da Medicina Interna, Internamento, Imagiologia, Laboratório e Cirurgia.

No serviço de Medicina Interna foi possível assistir a consultas e realizar o exame físico e de estado geral, assim como proceder à contenção de pacientes. Foi ainda possível participar, durante as consultas, em vários procedimentos, tais como a colheita de sangue venoso, venopunção para colocação de cateter e sistema de venoclise, limpeza e observação do conduto auditivo externo, limpeza de feridas, administração de fármacos por via oral e injetável, assim como vacinas, realização de pensos simples, raspagens cutâneas e recolha de amostras para análises, tanto cutâneas como de outro tipo, através de diversos métodos que também incluíram a punção. Foi

também possível a discussão de múltiplos casos clínicos, principais tratamentos e desenvolvimento do pensamento clínico. Foi ainda permitida a realização de consultas simples autonomamente, contando sempre com o apoio de algum médico ou enfermeiro.

Na área do Internamento foi possível o acompanhamento dos animais, assim como o desenvolvimento de autonomia nos procedimentos realizados. Nesta prestaram-se cuidados de higiene e alimentação e fez-se a administração de medicação por diversas vias que incluíram a *per os* (PO), subcutânea (SC), intramuscular (IM), endovenosa e tópica. Realizou-se, ainda, recolha de sangue venoso para análises laboratoriais, colocaram-se cateteres e sistemas de venóclise, realizou-se algaliação, lavagem vesical, pensos simples e limpeza de feridas, manutenção e monitorização de pacientes em estado crítico. Foram ainda realizadas com frequência a manutenção e monitorização de animais internados, com a avaliação da cor das mucosas, do tempo de repleção capilar, do pulso, da auscultação cardíaca e pulmonar, com a medição da temperatura retal e da glicemia e com a realização de palpação abdominal, bem como foram executados eletrocardiogramas, entre outros procedimentos. Este serviço permitiu, não só a familiarização com as doses de fármacos indicadas e seus nomes comerciais, como também contribuiu para o aumento da minha competência no relacionamento de várias espécies de animais, tendo permitido conhecer melhor os seus comportamentos e atitudes.

Na área da Imagiologia participou-se, principalmente, na realização de exames radiográficos e ecográficos. As atividades realizadas durante o exame radiográfico incluíram a contenção dos pacientes, escolha e posicionamento mais adequado a cada exame, realização de sedação quando necessário, assim como a interpretação das imagens obtidas. Incluiu ainda algumas sedações quando necessário. Durante o exame ecográfico, foi possível não só ajudar na contenção dos animais e discutir as imagens obtidas, como também realizar alguns procedimentos, como por exemplo cistocentese ecoguiada. Em várias ocasiões foi ainda possível iniciar o exame ecográfico autonomamente, de modo a obter algumas informações preliminares, acompanhando posteriormente a realização do exame ecográfico completo.

No Laboratório utilizaram-se todos os recursos disponíveis que incluíram o aparelho de hemograma, de análises bioquímicas, de ionograma, o microscópio, assim como a utilização de todos os materiais disponíveis para a realização de análise urinária, tais como tiras *dipstick*, refratómetro e centrífuga. Para além de ter sido possível recolher todos os tipos de amostras consideradas de interesse, foi ainda possível proceder à análise das mesmas, assim como à discussão dos resultados obtidos.

Na área de Cirurgia, numa fase inicial, foi possível assistir a todas as cirurgias realizadas, dentro e fora do horário determinado para o estágio. Nesta área, realizaram-se atividades de

preparação do paciente para a cirurgia que incluíram a colocação de cateter, determinação dos fármacos pré-cirúrgicos e preparação dos mesmos, assim como a sua administração, e ainda a limpeza e desinfecção do campo cirúrgico. Posteriormente, foi possível desempenhar funções de assistente de cirurgião, de anestesista, assim como de circulante. Como assistente de cirurgião, realizaram-se pontos cirúrgicos e, conseqüentemente, o encerramento da ferida cirúrgica. Realizaram-se ainda técnicas cirúrgicas simples, tais como castração de gatos. Foi ainda possível participar na monitorização pós-cirúrgica, bem como no controlo da dor.

Numa segunda fase, foi realizado um outro estágio extracurricular na Argentina, acompanhando o Doutor Pablo Manzuc, bem como outros colegas argentinos, nos seus locais de trabalho que incluíam o *Centro de Especialidades Médicas Veterinarias* (CEMV), o Laboratório de diagnóstico de animais de companhia (DIAP), a *Facultad de Ciencias Veterinarias* da Universidade de Buenos Aires (UBA), o *Centro Veterinario Integrado Sur* (CEVISUR), o *Hospital Veterinario del Oeste*, o consultório dermatológico de pequenos animais de Mar del Plata e outros pequenos consultórios em Buenos Aires e arredores.

Este estágio, que decorreu de 20 de janeiro de 2015 a 27 de abril de 2015, foi realizado, mais uma vez, na área de Clínica de Animais de Companhia e incluiu a participação em atividades de Medicina Interna (particularmente Dermatologia) e Laboratório de Análises Clínicas. Este estágio permitiu complementar e aprofundar as actividades previamente desenvolvidas na FMV-UL.

No serviço de Medicina Interna foi possível realizar consultas, recolher a história pregressa e clínica, recolher informação de interesse e realizar o exame físico e de estado geral. Foi ainda possível participar, durante as consultas, em procedimentos, tais como a colheita de sangue venoso, colocação de cateter e sistema de venoclise, limpeza e observação do conduto auditivo externo, administração de fármacos por via oral e injetável, recolha de amostras variadas para análises laboratoriais, incluindo citologias e biópsias, e foi ainda possível discutir casos raros, utilizar tratamentos e técnicas de diagnóstico semelhantes ou alternativas às que se realizam em Portugal, mas de igual eficácia.

No laboratório, foi possível utilizar todas as ferramentas disponíveis e realizar exames simples e rápidos que incluíam o hemograma, análises bioquímicas e de urina, assim como realizar culturas de fungos, exames citológicos e histopatológicos, principalmente de inflamações/infeções e de neoplasias, entre outros.

Durante os estágios foi ainda possível realizar cursos de pós-graduação nas áreas da Dermatologia, Citologia e Histopatologia, que trouxeram novas ferramentas para a atividade clínica veterinária.

Parte II

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Todos os anos um grande número de animais de companhia é vítima de picadas por insetos, podendo desenvolver reações alérgicas. Os cães são animais muito curiosos, adoram correr e perseguir alvos que incluem insetos himenópteros, como abelhas ou vespas, sendo por isso muito vulneráveis a picadas dos mesmos.

O primeiro registo de uma reação alérgica fatal, pela picada de uma vespa em pessoas, está datado do ano de 2641 a.C. e ocorreu no antigo Egito, estando tudo registado numa placa de ébano do faraó Menés (Krombach, Kampe, Keller & Wright, 2004).

Braun, em 1925, documentou pela primeira vez o uso de veneno de inseto para diagnóstico e tratamento de casos em medicina humana (Braun, 1925). Por sua vez, Benson e Semenov experimentaram, pela primeira vez, o uso de imunoterapia específica com extrato de corpo total de abelhas num apicultor (Benson & Semenov, 1930) e foi Mary Loveless que, em 1950, descreveu a eficácia do uso de extratos de veneno de vespa no diagnóstico e terapêutica (Loveness, 1956). Contudo, apenas no final da década de 70 apareceram os primeiros estudos a demonstrar a superioridade da imunoterapia com extratos de veneno face aos extratos de corpo total (Alves *et al.*, 2008).

Os himenópteros, em particular as abelhas, as vespas e as polistes, são insetos que conseguem percorrer vários quilómetros de distância desde a sua colmeia, na procura de néctar e pólen. (Sponsler & Johnson, 2015) e são considerados insetos sociais que vivem em colónias. As abelhas do mel são facilmente encontradas em campos de flores, colmeias feitas pelo homem e árvores. Os himenópteros do género *Vespula* (exemplo a vespa comum) fazem ninhos debaixo de terra, enquanto as do género *Vespa* (exemplo a *Vespa crabro*) e *Dolichovespula* (exemplo a *D. sylvestris*) na sua grande maioria, fazem ninhos em árvores ou outras estruturas aéreas (Cowell & Cowell, 1995).

Na natureza, as doenças imunomediadas, como as doenças alérgicas, autoimunes, imunodeficiências ou neoplasias, são complexas e multifatoriais, como tal, apenas alguns indivíduos têm predisposição e uma combinação de fatores adequados para desencadear a doença, neste caso a alergia (Martins, 2010).

2. Epidemiologia e Incidência

Em medicina humana, a frequência da alergia à picada por himenópteros pode ser avaliada por estudos transversais, baseados na anamnese e/ou em provas cutâneas e testes de

determinação das concentrações de imunoglobulinas E (IgE) específicas. Biló *et al.* estimam que, na europa, as reações locais exuberantes ocorrem em 2,4% a 26,4% da população, sendo que em crianças a prevalência é de 19,0% e nos apicultores de 38,0% (Biló *et al.*, 2005). Num estudo polaco (Nittner-Marszalska *et al.*, 2004) a prevalência ronda os 11,8% e num estudo espanhol (Fernandez, Sorianow, Mayorgaz & Mayor, 2005) ronda os 15,8%.

Nas reações sistémicas, Biló *et al.* (2005) refere uma prevalência que ronda entre 0,3% e 7,5% na população, sendo que nos apicultores sobe para valores entre 14,0% a 43,0% e em crianças, na Europa, a prevalência ronda os 0,15% a 0,3%. No estudo de Nittner-Marszalska *et al.* (2004), a prevalência foi ligeiramente mais alta, rondando os 8,9%. Num estudo de Fernandez *et al.* (2005), em Espanha, a prevalência rondou os 2,8%.

De acordo com as *guidelines* da *British Society for Allergy and Clinical Immunology* (BSACI), tanto estudos americanos como europeus concluíram que as mortes em pessoas pela picada de himenópteros são raras e ocorrem em 0,03 a 0,4 casos por 100 000 habitantes por ano (Krishna *et al.*, 2011).

Em medicina veterinária, a incidência de reações anafiláticas em animais de companhia é desconhecida (Müller, Janda, Jensen-Jarolim, Ryner & Marti, 2016). Não foi possível encontrar, nas principais fontes bibliográficas, dados relativos à incidência de picadas por himenópteros em cães, tratando-se de um estudo difícil por diversas causas. Os autores consideram que, em primeiro lugar, ao contrário do que acontece em medicina humana, as reações anafiláticas não são de registo obrigatório (no caso específico da medicina humana, em Portugal, estes registos são mandatórios no Catálogo Português de Alergias e Reações Adversas) (NP 014/2012, 2012), como tal, não se consegue saber quantos casos ao certo surgem por ano. Em segundo lugar, é muito difícil saber se as reações alérgicas são verdadeiramente causadas ou não pela alergia aos himenópteros. Para isso, seria necessário realizar testes de diagnóstico que permitissem saber com alguma exatidão se a alergia é verdadeiramente aos himenópteros ou se é algo relacionado com os principais diagnósticos diferenciais. Em terceiro lugar, alguns casos fatais podem ser pré-hospitalares e os cães poderão não receber socorro por morte no local (Mughal, Abbas, Saqib & Muhammad, 2014). Por último, muitos dos casos consistem em reações locais de pequenas extensão e autolimitadas e não são suficientemente graves para que os proprietários dos animais os levem de urgência ao veterinário (Fritzgerald & Flood, 2006). Desconhece-se, por isso, a verdadeira incidência de reações locais ou sistémicas em cães. O que se sabe é que, segundo um estudo realizado em animais por Kelly Hall no Minnesota (Hall, 2009), o envenenamento por animais constitui uma das cinco principais causas de exposição a toxinas. Dentro destes as picadas por abelhas e vespas são consideradas as situações mais comuns. Trata-se por isso de um assunto com extrema relevância para os veterinários.

Relativamente ao nosso país, não foram encontrados nas principais referências bibliográficas quaisquer tipos de dados epidemiológicos em animais. Em medicina humana, os primeiros dados do registo de anafiláxia em Portugal no CPARA (Catálogo Português de Alergias e Reações Adversas), permitem estimar que 3,0% dos casos se relaciona com venenos de himenópteros (Mota *et al.*, 2015).

3. Fatores de risco

Os fatores de risco responsáveis por desenvolver reações graves têm sido muito investigados em medicina humana, de forma a poder prevenir este tipo de reações pelas picadas dos himenópteros. Embora pouco estudados em medicina veterinária, calcula-se que os fatores de risco nos animais sejam semelhantes aos dos seres humanos (Boord, 2014).

De acordo com a bibliografia (Krishna *et al.*, 2011), os fatores de risco podem dividir-se em dois grupos: aqueles que determinam a frequência e a gravidade das reações sistémicas e aqueles que determinam a frequência das picadas

Relativamente aos fatores que determinam a frequência das reações sistémicas, temos de considerar os seguintes:

- i. Intervalo entre picadas / Número: O intervalo de tempo entre picadas é um fator de risco muito importante. O risco de uma reação anafilática é maior para intervalos de tempo curtos e o mesmo diminui 20 a 30% passados 10 anos após a picada (Golden *et al.*, 1997 citado por Boord, 2014). Para além do intervalo entre inoculações, deve também ser referido o número de picadas. Ser picado frequentemente parece induzir algum tipo de tolerância. Segundo um estudo espanhol (de la Torre-Morin, Garcia-Robaina, Vázquez-Moncholi, Fierro & Bonnet-Moreno, 1995), um apicultor picado 25 vezes por ano parece ter mais reações sistémicas do que um picado 200 vezes por ano.
- ii. Reações anteriores: Deve ainda ser referida a gravidade da reação anterior, já que esta influencia significativamente o tipo de reação à segunda picada, sendo por isso um fator a ter em consideração. Indivíduos que tiveram anteriormente uma reação local extensa à picada têm 5 a 10% maior probabilidade de desenvolver uma reação sistémica na próxima inoculação (David & Golden, 2003). Pacientes com história anterior de reação anafilática sistémica têm uma probabilidade de 57 a 75% de desenvolver sinais sistémicos, quando são picados uma segunda vez (Hunt *et al.*, 1978 citado por Boord, 2014).
- iii. Sensibilização: A sensibilização ao veneno, mediada por IgE, constitui um fator de risco importante para a ocorrência de reações sistémicas futuras. Sabe-se contudo que os níveis de IgE específica do veneno não se correlacionam diretamente com a gravidade da reação sistémica e

que todos os pacientes têm possibilidade de ter reações anafiláticas fatais (Krishna *et al.*, 2011). As *guidelines* da BSACI incluem, por isso, a sensibilização como um fator de risco a ter em consideração. De referir ainda que a sensibilização pode ocorrer sem reação clínica (Annala, 2000), não sendo por isso indicativa da gravidade presente ou futura da reação alérgica.

- iv. Veneno: O tipo de veneno envolvido é também um fator significativo. Embora existam alguns estudos sobre a maior gravidade de venenos de diferentes tipos de himenópteros, não existe uma escala de maior ou menor gravidade consoante o tipo de himenóptero. Segundo van der Linden, Hack, Struyvenberg e van der Zwan (1994), pacientes picados por abelhas de mel apresentam maior risco de terem reações sistémicas do que aqueles picados por vespas. Contudo, segundo um estudo mais atual (Antonicelli, Biló, Napoli, Farabollini & Bonifazi, 2003), o risco de reação sistémica é mais elevado na *Vespa crabro* do que em qualquer outra vespa ou abelha. De referir ainda que a *Vespa crabro* é uma espécie autóctone de Portugal.
- v. Atopia: Em medicina humana, a atopia é considerada um fator de risco (Krishna *et al.*, 2011), embora existam estudos controversos. Segundo alguns autores (Novembre *et al.*, 1998 citado por Krishna *et al.*, 2011; Birnbaum, Vervloet & Charpin, 1994), a alergia ao veneno de himenópteros não parece ser mais comum nos indivíduos atópicos, e um estudo recente concluiu que os indivíduos atópicos tinham reações menos graves e frequentes que os indivíduos não atópicos (Gelincik *et al.*, 2015). Já relativamente à medicina veterinária, a relação entre a dermatite atópica e a hipersensibilidade a insetos é igualmente controversa (Miller, Griffin & Campbell, 2013). Mas, segundo estes autores, não existe até à data evidência que suporte a hipótese de que os cães com dermatite atópica estejam mais predispostos a reações alérgicas mais ou menos frequentes ou graves à picada por himenópteros.

Relativamente aos fatores que determinam a gravidade das reações sistémicas, devemos considerar os seguintes:

- i. Idade: Diversos estudos em medicina humana concluíram que indivíduos mais novos tendem a ter reações mais moderadas (Chipps, Valentine, Kagey-Sobotka, Schuberth & Lichtenstein, 1980), como urticária ou angioedema, enquanto indivíduos adultos mais comumente têm obstrução das vias respiratórias ou hipotensão (Lockey *et al.*, 1988). Assim, realizando um paralelismo, podemos prever como provável que cães mais novos estarão mais predispostos a reações menos graves e cães adultos mais predispostos a reações mais graves.
- ii. Doenças cardiorrespiratórias e terapêuticas com beta-bloqueadores: Os mediadores de anafilaxia são normalmente inibidos por mecanismos neurohormonais beta-adrenérgicos e, considerando que os beta-bloqueadores perturbam o equilíbrio homeostático desses controlos, as reações anafiláticas tendem a ser mais graves, já que vai haver uma maior

libertação de mediadores, uma maior resposta a nível cardiorrespiratório e consequentemente um risco maior para a vida do animal, no caso de reação anafilática (Müller & Haeberli, 2005).

- iii. Mastocitose/Triptase: A mastocitose é um distúrbio heterogéneo caracterizado pela proliferação e acumulação de mastócitos na pele, medula óssea e outros tecidos e causado pela mutação no gene c-Kit (Piao & Bernstein, 1996 citado por Bonadonna, Zanotti & Müller, 2010). A triptase é um mediador dos mastócitos presente em duas formas (alfa e beta). A beta encontra-se armazenada nos mastócitos e é libertada durante a sua ativação (Bonadonna, Zanotti & Müller, 2010). Um estudo europeu, em pessoas, confirmou a relação entre o aumento da triptase sérica basal com a gravidade das reações alérgicas às picadas (Ruëff, 2009 citado por Bonadonna, Zanotti & Müller, 2010).

Para além deste primeiro grande grupo de fatores de risco, existe, tal como foi referido, outro grupo relativo aos fatores que influenciam a frequência das picadas, dentro do qual destacamos os fatores ambientais e os fatores sociais que podem predispor os cães a mais ou menos picadas por himenópteros.

A nível ambiental, o clima surge como fator fundamental, enquanto a nível social, há que destacar como um alto fator de risco a predisposição de quem pratica a apicultura, mais especificamente neste estudo a dos seus cães, à picada dos himenópteros.

- a. Clima: Estudos em seres humanos revelam que a prevalência de reações alérgicas na população geral é bastante variável (Annala *et al.*, 2000) e estas variações são explicadas com base nas diferenças climáticas. Em climas mais quentes, o comportamento das abelhas tende a ser mais agressivo. Nas estações do ano de temperaturas elevadas, como são o final da primavera e o verão nas zonas mediterrânicas, as abelhas encontram-se mais ativas (Mingomataj, 2003). O clima deve por isso ser um foco de atenção e um fator de risco a levar em consideração.
- b. Apicultura: Os apicultores são considerados um grupo de alto risco, visto que apresentam maior exposição aos himenópteros (Bousquet, Menardo, Aznar, Robinet-Levy & Michel, 1984; de la Torre-Morin *et al.*, 1995). Dada a proximidade, os cães de proprietários de colmeias de abelhas são também mais vulneráveis à picada. Também os cães cujos proprietários vivem próximos de zonas dedicadas à apicultura estão igualmente expostos a este risco, sendo por isso importante destacar este fator.

4. Entomologia dos himenópteros

Os artrópodes são invertebrados que têm um exosqueleto articulado de quitina, sendo os insetos a classe mais numerosa. Conhecidos pela sua organização social muito complexa, os himenópteros são insetos de metamorfose completa, contendo dois pares de asas solidárias durante o voo, cuja larva não consegue viver sozinha. Estes insetos pertencentes à ordem *hymenoptera* abundam em toda a Europa, nomeadamente no nosso país. Estes insetos venenosos possuem a capacidade de picar, graças a um ovipositor modificado encontrado na parte terminal do abdómen.

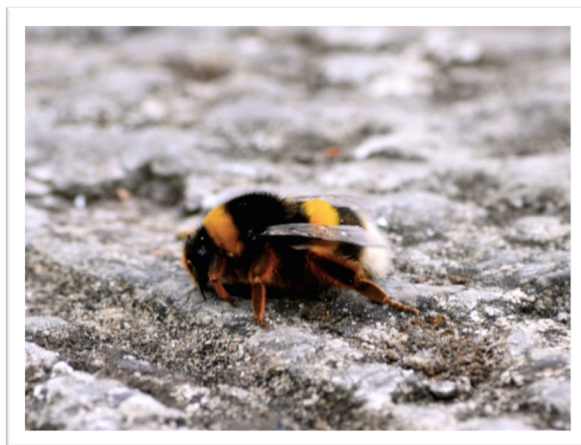
A classificação atual tem por base a classificação de Chinery (1984), e apesar de algumas modificações ao longo dos anos, mantem-se bastante semelhante. Segundo Fitzgerald e Flood (2006), os três grupos com maior importância, pelas suas implicações em medicina, são os grupos *Apoidea* (Abelhas com 20.000 espécies), *Vespoidea* (Vespas com 15.000 espécies), e ainda *Formicidae* (Formigas com 15.000 espécies).

A família Apidae inclui as vulgares *Apis mellifera* (abelhas de mel) e os *Bombus* (zangões).

FIGURA 1 - ABELHA (*APIS MELLIFERA*) (ORIGINAL)



FIGURA 2 - ZANGÃO (*BOMBUS TERRESTRIS*) (ORIGINAL)



As abelhas de mel são insetos sociais herbívoros que se alimentam de pólen e néctar, produzindo mel e cera em colmeias. Especificamente as obreiras possuem um ferrão venenoso, no final do abdómen, utilizado para defender a colmeia. Um método rápido para identificar os diferentes grupos é a contagem do número de picadas (Reisman, 1994 citado por Fitzgerald & Flood, 2006). As abelhas de mel só têm a capacidade de picar uma vez, dado que o ferrão apresenta um extremo dentado que impede a sua saída da pele da vítima e que provoca a morte do inseto por evisceração, logo após a primeira picada (Rodrigues & Ribeiro, 2013).

As vespas são animais carnívoros que vivem alimentando-se de outros insetos e néctares. Também são animais sociais, com abdómen listado de cor negra e amarela. O seu ferrão não fica inserido na pele da vítima, logo elas podem picar mais do que uma vez, sem que morram.

A família *Vespidae* é dividida em *Vespinae* (*Vespa*, *Dolichovespula*, *Vespula*) e *Polistinae* (*Polistes*). Dentro do género *Vespula*, a espécie mais frequente e importante na europa é a *V. vulgaris*. No género *Dolichovespula*, as mais importantes são a *D. media* e a *D. saxonica*.

FIGURA 3 - VESPA-PAPEL (*P. DOMINULUS*) (ORIGINAL)



FIGURA 4 - VESPA (*V. CRABRO*) (ORIGINAL)



Dentro do género *Vespa*, a *Vespa crabro* é a espécie mais frequente na Europa, principalmente na zona mediterrânica. Dentro das *Polistes*, a *P. Dominulus*, ou vespa do papel, é a mais frequente na bacia mediterrânica, dispersando-se apenas nesta região (Fernández, 2004; Sánchez, 2013). Embora existam diferenças significativas na distribuição de picadas em medicina humana, as picadas das *Vespulas* predominam sobre as *Polistes* ou Vespas na europa, exceção feita na zona mediterrânica (Fernández, 2004). As vespas são capazes de picar e injetar múltiplas doses de veneno, sendo por isso bastante mais agressivas que as abelhas de mel, exceção feita às abelhas de mel africanas chamadas também de *killer bees* (Schmidt & Hassen, 1996; Golden *et al.*, 2011). Considerada a mais agressiva no continente asiático (Barthélémy, 2008 citado por López, González & Goldarazena, 2011), a *Vespa velutina*, também conhecida como vespa asiática, é uma espécie proveniente do continente asiático, e como tal, não autóctone de Portugal, que surgiu em França por volta de 2005 (de Haro *et al.*, 2010) e que neste momento se encontra dispersa por toda a península ibérica. É considerado um problema de saúde emergente (Purroy *et al.*, 2013; López, González & Goldarazena, 2011; de Haro *et al.*, 2010) dada a sua agressividade e, como tal, trata-se de um assunto de crescente importância para pacientes alérgicos à picada de himenópteros, quer pessoas, quer animais.

A morte de pacientes resultante da picada dos insetos pode ocorrer de diferentes maneiras. Grande parte delas é resultado de uma hipersensibilidade imediata que causa uma reação anafilática. Contudo, a morte pode também ocorrer por obstrução isolada das vias aéreas, nomeadamente quando as picadas ocorrem no pescoço ou na própria mucosa oral.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA DOS INSETOS HIMENÓPTEROS MAIS RELEVANTES DESDE O PONTO DE ALERGIA NA PENÍNSULA IBÉRICA (ADAPTADO DE RODRIGUES E RIBEIRO, 2013).

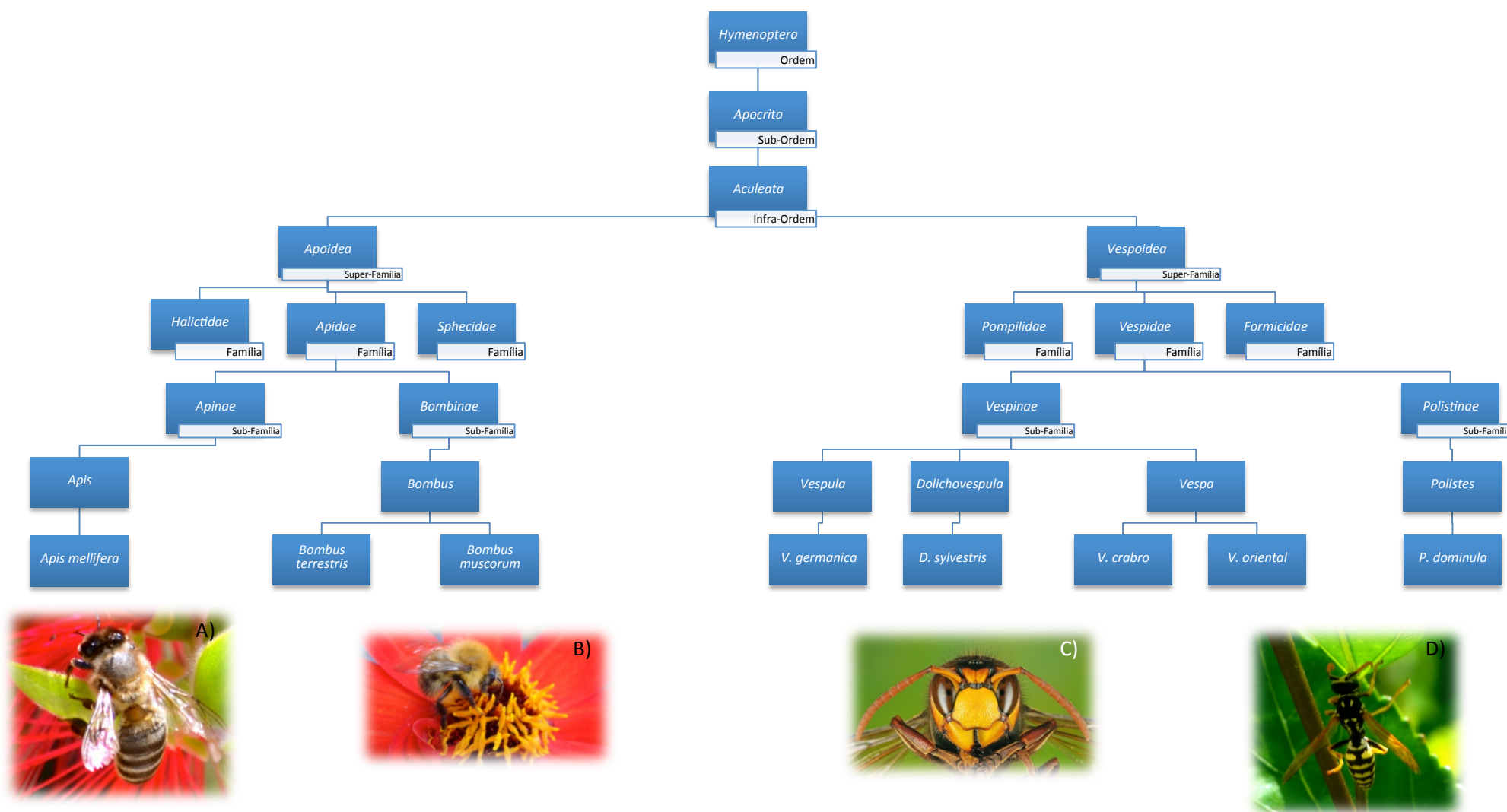


FIGURA. 5 - A) *Apis mellifera* (Original); B) *Bombus muscorum* (cedido por Joana Cardoso); C) *Vespa crabro* (cedido por Arcangelo Manoni); D) *Polistes dominulus* (Original).

5. Alergénios dos venenos

5.1. Principais alergénios

A maioria dos venenos dos insetos é composta por alergénios muito reativos e farmacologicamente ativos, sendo responsáveis por diferentes tipos de reações, quando inoculados numa vítima.

O veneno dos himenópteros, especificamente, é composto por uma mistura complexa de proteínas com potencial alergénico, antigénios ativos e péptidos (Fritzgerald, 2013). Tanto o veneno de abelha como o veneno de vespa são constituídos principalmente por proteínas.

De todos os componentes constituintes do veneno das abelhas de mel, a melitina é aquele com maior importância (Markovic-Housley *et al.*, 2000), atuando como um detergente que rompe as membranas celulares e liberta aminas biogénicas e potássio (Banks, 1986 citado por Fitzgerald, 2013). A melitina é uma proteína que hidrolisa as membranas celulares, altera a permeabilidade celular e leva à libertação de histamina. É o agente maioritariamente responsável pela dor local. A melitina leva também à libertação de catecolaminas que atuam com a fosfolipase A₂ para causar hemólise intravascular (Fritzgerald, 2013).

Além da melitina são ainda conhecidos outros componentes, especificamente o péptido 401, a fosfolipase A₂ e a hialuronidase. O péptido de desgranulação dos mastócitos, também conhecido por péptido 401, é responsável não só pela desgranulação dos mastócitos, como também pela libertação de histamina e de outras aminas vasoativas. A fosfolipase A₂, por sua vez, é o maior componente alérgico do veneno das abelhas (Hoffman, 2006) e atua concomitantemente com a melitina. A hialuronidase provoca alterações da permeabilidade da célula, através da rutura do colagénio e alteração da membrana celular, permitindo que o veneno penetre nos tecidos da vítima.

O veneno contém ainda aminas vasoativas como histamina, dopamina, norepinefrina e outras proteínas não identificadas (Hahn & Lewin, 2002 citado por Fitzgerald, 2013). Além disto, contém também apamina, uma neurotoxina que atua na medula espinal.

O veneno dos zangões contém fosfolipase A₂, proteases, hialuronidase, fosfatase ácida e outras proteínas não encontradas no veneno das abelhas de mel (Hoffman & Jacobson, 1996).

O veneno das vespas é composto maioritariamente por três proteínas que podem funcionar como alergénios (fosfolipase A₁, hialuronidase e antígeno 5) (Müller, 2002, Savi *et al.*, 2016) e ainda por uma vasta variedade de aminas vasoativas e péptidos (Lichtenstein, Valentine & Sobotka, 1979 citado por Fitzgerald, 2013). O maior composto alergénico do veneno chama-

se antigénio 5 (Monsalve, Lu & King, 1999). A melitina não existe no veneno das vespas e, como tal, a dor intensa da picada das vespas é produzida pelas cininas, serotonina e acetilcolina (Fritzgerald, 2013).

A tabela 2 apresenta em detalhe os diferentes componentes do veneno das distintas espécies de himenópteros.

TABELA 2. ALERGÉNIOS DO VENENO DE HIMENÓPTEROS (ADAPTADO DE KRISHNA ET AL., 2011).

Alergénios do veneno de himenópteros		
Veneno	Componentes (a negrito os alergénios <i>major</i>)	
Abelha de mel (<i>Apis mellifera</i>)	Fosfolipase A₂ (PLA2) Hialuronidase Fosfatase ácida Melittina	Alergénio C (dipeptidilpeptidase) Serina protease Proteína 10kDa
Zangão (<i>Bombus</i> spp.)	Fosfolipase A₂ (PLA2) Hialuronidase Fosfatase ácida	Protéase Fração-4
<i>Polistes</i> spp.	Fosfolipase A₁ (PLA1) Hialuronidase Antigénio-5	Polistina
<i>Vespula</i> spp.e <i>Dolichovespula</i> spp.	Antigénio-5 Fosfolipase A₁ (PLA1) Hialuronidase	
<i>Vespa</i> spp.	Antigénio-5 Fosfolipase A₁ (PLA1) Hialuronidase	

Segundo um artigo recente (Müller *et al.*, 2016), não se sabe se os cães e pessoas se sensibilizam aos mesmos alergénios dos venenos, ou seja, se partilham os mesmos alergénios *major*.

5.2. Reações cruzadas

Diversos artigos permitiram concluir que existe uma reação cruzada entre diferentes tipos de veneno de himenópteros (King, Lu, Gonzales, Qian & Soldatova, 1996; Stapel, Wanders-Lijster de Raadt, van Toorenenbergen & de Groot, 1998; Müller, 2002 citado por Biló *et al.*, 2005; Hoffman, 1993 citado por Biló *et al.*, 2005; Blanca *et al.*, 1991 citado por Biló *et al.*, 2005; Hemmer, 2008; Savi, Peveri, Makri, Pravettoni & Incorvaia, 2016). Dentro da família das *Apidae*, a informação disponível sugere que os venenos e os maiores compostos alérgicos das diferentes abelhas de mel existentes no mundo são muito semelhantes, em grande parte pela grande similaridade do composto alérgico presente em maior concentração, a fosfolipase A₂ (Hoffman, 2006). Apesar de terem grande proximidade, a fosfolipase A₂ do zangão é apenas 53% idêntica à da abelha de mel, percentagem ainda assim suficiente para que exista

reação imunológica cruzada entre os dois venenos (Stapel, Wanders-Lijster de Raadt, van Toorenenbergen & de Groot, 1998).

Dentro da família das *Vespidae*, os diferentes venenos das diversas espécies da subfamília *Vespinae* são muito semelhantes entre si, dada a sua composição e a estrutura dos alergénios por isso, apresentam fortes reações cruzadas (King, Lu, Gonzales, Qian & Soldatova, 1996) As *Polistes* da subfamília *Polistinae* têm também altas reações cruzadas entre si. A reação cruzada entre as subfamílias *Polistinae* e *Vespinae* é mais baixa (Müller, 2002 citado por Biló *et al.*, 2005; Hoffman, 1993 citado por Biló *et al.*, 2005; Blanca *et al.*, 1991 citado por Biló *et al.*, 2005) do que as reações dentro de cada uma das subfamílias.

De referir ainda que a reação cruzada entre abelhas e vespas é possível. O maior composto da reação cruzada entre abelhas e vespas é a hialuronidase (Hemmer, 2008), dado que esta enzima apresenta aproximadamente 50,0% de homologia na sequência dos venenos de abelhas e de vespas (King *et al.*, 1996). Contudo, estudos futuros poderão dar mais informações sobre este tipo de reação cruzada.

Outra causa importante para a reação cruzada muito estudada atualmente é a reatividade das IgE aos determinantes reativos carboidratados (CCDs) (Spillner, Blank & Jakob, 2014). Os CCDs parecem estar presentes em grande parte dos venenos dos himenópteros, contudo os venenos das espécies *Polistes* parecem não ter os resíduos $\alpha(1,3)$ -fucose responsáveis pela reação das IgE aos CCDs (Spillner, Blank & Jakob, 2014).

5.3. Dose letal

A picada de inseto pode matar um cão de distintas maneiras, embora seja um fenómeno muito raro de ocorrer.

Grande parte das mortes em cães é devida à anafilaxia causada pelas reações de hipersensibilidade imediata. No entanto, alguns animais, assim como algumas pessoas, podem sucumbir devido a uma reação local de grande intensidade que provoca obstrução das vias respiratórias. Existe ainda uma terceira causa relacionada com um grau elevado de envenenamento, provocado por ataques de enxames, que pode inclusive matar indivíduos não alérgicos às picadas.

A dose letal estimada é de cerca de 20 picadas/kg, em grande parte dos mamíferos (Fritzgerald, 2013). Foi estimado que a quantidade de veneno que uma abelha injeta por picada é de 147 μ g, enquanto que a da vespa é de 17 μ g por picada (Fritzgerald, 2013). Uma picada é suficiente para poder matar um indivíduo, já que a reação anafilática não é dose-dependente.

6. Reações alérgicas ao veneno dos himenópteros

6.1. Introdução teórica

As reações imunológicas de hipersensibilidade foram pela primeira vez descritas e classificadas por P.G.H. Gell e R.A.A. Coombs, em 1963, num texto publicado na revista *Clinical Aspects of Immunology*, e a sua classificação da hipersensibilidade continua a ser a pedra basilar da imunologia humana e veterinária modernas (Gell & Coombs, 1963).

A hipersensibilidade é um fenómeno de sensibilização imunológica de um indivíduo, quer seja o ser humano ou canídeo, a uma exposição repetida a um antigénio (neste caso alergénio) que ocorre ao longo do tempo. Um indivíduo sensibilizado pode reagir excessivamente ou de uma maneira inapropriada a uma subsequente exposição ao alergénio, o que conduz à manifestação da doença alérgica. Os alergénios encontram-se normalmente dispersos pelo ambiente e apenas os indivíduos geneticamente suscetíveis reagem de uma maneira exagerada. A classificação de Gell e Coombs identifica quatro formas de reação de hipersensibilidade: tipo I, tipo II, tipo III e tipo IV (Tizard 2013a).

As reações de hipersensibilidade tipo I, também chamadas de hipersensibilidade imediata, são formas de inflamação resultantes da interação de antigénios com IgE ligadas aos seus recetores IgE na superfície dos mastócitos, basófilos e também eosinófilos (Bonadonna, Zanotti & Müller, 2010; Tizard, 2013a; Shmuel & Cortes, 2013). Esta interação leva à desgranulação e libertação de mediadores, como histamina, serotonina, heparina, proteases como a triptase e proteoglicanos, e à síntese de mediadores químicos pró-inflamatórios, derivados do ácido araquidónico, como prostaglandina D₂, leucotrienos B₄ e o fator ativador de plaquetas, entre outros. São ainda sintetizadas e libertadas citocinas e quimiocinas, como a interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-33 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Shmuel & Cortes, 2013), entre outros. Os sinais clínicos deste tipo de hipersensibilidade resultam da libertação excessiva e abrupta de mediadores inflamatórios que vão originar diferentes manifestações clínicas, como por exemplo urticária ou angioedema, ou até situações de anafilaxia muito graves (Kishiyama *et al.*, 2001). A hipersensibilidade tipo I é a mais característica das reações alérgicas à picada de himenópteros. Dependendo do número e localização das células inflamatórias (mastócitos, basófilos e eosinófilos), a situação pode ser de gravidade variável (Tizard, 2013a). Por sua vez, a resposta depende do grau de sensibilização do animal, da quantidade de antigénio envolvido e da maneira como é inoculado. A anafilaxia pode ocorrer se a frequência de libertação de moléculas vasoativas

dos mastócitos exceder a sua capacidade de responder às alterações rápidas no sistema vascular, podendo o animal perecer (Tizard, 2013a).

A hipersensibilidade tipo II, também chamada de citotóxica, é aquela que envolve a destruição da célula alvo, por exemplo, a destruição de hemácias transfundidas, quando administradas a um dador incompatível (Tizard, 2013b). É mediada por Imunoglobulina G (IgG) ou Imunoglobulina M (IgM) ou ativação do sistema complemento (Kishiyama, Tevrizian & Ávila, 2001).

A hipersensibilidade tipo III é aquela na qual há um depósito de imunocomplexos, de antígenos e anticorpos, localmente nos tecidos que culmina em reações inflamatórias locais ou multissistêmicas muito características das doenças virais (Tizard, 2013c).

A hipersensibilidade tipo IV ou tardia é mediada por linfócitos T e células *natural killer*, sendo característica das reações positivas à tuberculina intradérmica (Tizard, 2013d). Em medicina humana está descrito um padrão de reação rara à picada de himenópteros, relacionada com hipersensibilidade tipo III, que será abordado no decorrer deste trabalho (Biló *et al.*, 2005; Boord, 2014).

6.2. Sinais clínicos

Uma picada de um inseto himenóptero pode produzir diferentes tipos de reações e sinais.

Existem, por isso, diferentes reações imunitárias às picadas, descritas quer em pessoas, quer em animais de companhia.

Alguns pacientes que não reagem à primeira picada podem reagir às seguintes (David & Golden, 2003), por isso, não se pode definir logo à partida, a partir dos sinais clínicos, um animal como não alérgico aos himenópteros, já que poderá apresentar, no futuro, uma reação alérgica à picada.

De acordo com alguns autores (Cowell & Cowell, 1995; Biló *et al.*, 2005), existem quatro tipos de reações distintas à picada por himenópteros: as reações locais normais, as reações locais de grande extensão, as reações sistêmicas alérgicas e as reações sistêmicas tóxicas.

Nos cães, as reações mais comuns são as reações locais normais. Apresentam-se normalmente por uma reação edematosa ligeira com dor e com algum eritema localizado, causados sobretudo pela toxicidade do veneno, mais especificamente pelos seus compostos vasoativos. Dependendo do local da picada, o animal pode lamber ou esfregar a área afetada no chão, agravando a reação. Apesar de muito frequente, este tipo de reação raramente é apresentada ao veterinário, dado ser autolimitada, ou seja tem resolução rápida e espontânea num espaço de poucas horas (Cowell & Cowell, 1995).

Alguns animais, contudo, desenvolvem reações mais extensas, com largas zonas de eritema e edemas locais, que, por vezes, se podem estender a toda a face, membros afetados ou outras regiões. São classificadas como reações locais de grande extensão e têm uma forte resposta imunológica envolvida. Os edemas são normalmente de grandes dimensões (>10 cm de diâmetro) ou dispersos regionalmente. Atingem o pico até às 48 horas e podem durar alguns dias (Cowell & Cowell, 1995).

FIGURA Nº 6 - ANGIOEDEMA DA CABEÇA



(FOTO CEDIDA POR: A) DRA. ANA RIOS, B) DRA. CANDANCE SOUSA, C) DR. KRISTIAN PEDERSEN E D) DR. RAMÓN M. ALMELA).

Embora sejam classificadas como de baixa gravidade, estas reações podem ser mortais, se a picada ocorrer numa área vital, como a zona das vias respiratórias superiores, devido ao edema da orofaringe e consequente bloqueio das vias respiratórias (Biló *et al.*, 2005). No entanto, muitos dos casos resolvem-se sem tratamento.

As reações mais graves à picada de himenópteros são as reações sistémicas alérgicas ou anafiláticas. Embora a incidência exata em animais de companhia seja desconhecida, sabe-se que nas pessoas varia entre 1 e 3% dos casos (Fitzgerald, 2013).

Ocorrem em paciente com anticorpos IgE específicos aos componentes alérgicos do veneno de himenópteros e surgem aproximadamente 15 minutos após a picada (Cowell & Cowell, 1995). Se não houver reação sistêmica alérgica em 30 minutos, é pouco provável que venha a ocorrer (Frazier, 1976) e as reações anafiláticas não estão dependentes do número de picadas (Fitzgerald, 2013).

Apesar das reações anafiláticas serem principalmente mediadas por IgE, podem contudo ser também influenciadas por anticorpos IgG e ainda por ativação do complemento por complexos IgG do veneno (Biló *et al.*, 2005).

Trata-se normalmente de uma reação anafilática caracterizada por variados graus de urticária ou angioedema, náusea, vômitos e diarreia, hipotensão e dispneia relacionados com uma reação de hipersensibilidade (Biló *et al.*, 2005). Em cães, estão descritos alguns sinais como edema exuberante, incontinência urinária e fecal, vômito, fraqueza muscular, depressão respiratória, síncope, convulsões, coma e morte (Cowell & Cowell, 1995).

FIGURA Nº 7 - REAÇÕES URTICARIFORMES



(FOTOGRAFIAS CEDIDAS POR: A) DR. RAMÓN M. ALMELA E B) DR. MICHELE CORAZZA).

O edema das vias respiratórias pode levar a uma congestão da laringe, mais especificamente da epiglote, comprometendo o bom funcionamento das vias respiratórias superiores e levando à morte do animal, tal como acontece nas reações locais de grandes dimensões.

Existe uma panóplia de sinais clínicos descritos devido às reações anafiláticas e normalmente, em medicina humana, utiliza-se a classificação de Müller (1966) para definir o grau da reação anafilática (Tabela 3). Há quem use também a classificação de Ring e Messmer para classificar as mesmas reações.

A classificação de Müller (1966) encontra-se dividida em graus de I a IV. No grau I são incluídos alguns sinais sistêmicos da pele, como urticária, prurido, e também ansiedade e mal-estar. O grau II inclui, não só todos os sinais de grau I, mas também angioedema, tonturas e sinais gastrointestinais como vômitos, diarreia e dor abdominal. O grau III adiciona sinais respiratórios como dispneia e sibilos, fraqueza, confusão e disfonia, enquanto o grau IV acrescenta baixa da pressão sanguínea, colapso, perda de consciência, incontinência, apneia, cianose e paragem cardíaca.

TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE REAÇÃO SISTÊMICA ALÉRGICA EM PESSOAS (ADAPTADO DE MÜLLER, 1966).

Classificação do grau de reação sistêmica alérgica em pessoas		
Grau I	Urticária generalizada; Prurido;	Mal-Estar; Ansiedade;
Grau II	Sinais do Grau I e/ou sinais como: Angioedema; Tontura;	Vômito; Diarreia; Dor Abdominal;
Grau III	Sinais do Grau II e/ou sinais como: Dispneia; Sibilos;	Fraqueza; Disfonia;
Grau IV	Sinais de Grau III e/ou sinais como: Baixa pressão sanguínea; Colapso/ Síncope; Perda de consciência;	Apneia; Incontinência urinária e fecal; Cianose; Paragem Cardiorrespiratória.

Encontram-se também descritos em pessoas casos que se pensam, até à data, ser de hipersensibilidade tipo III, embora não tenham sido encontrados imunocomplexos circulantes (Biló *et al.*, 2005; Boord, 2014). Não foram, contudo, encontradas nenhuma referências bibliográficas referentes a este aspeto em cães. Os sinais só surgem 3 dias a 2 semanas após exposição ao veneno e os pacientes apresentam sinais de doença semelhante à do soro. Os pacientes afetados surgem com dores articulares, febre, linfadenopatias, esplenomegalia, proteinúria, mal-estar e erupções cutâneas. Podem ainda surgir vasculite, glomerulonefrite, neuropatia, artrite e coagulação intravascular disseminada (CID). Dada toda a informação disponível, é possível definir os sinais clínicos dos cães em ligeiros, moderados e graves (Tabela 4).

TABELA 4. SINAIS CLÍNICOS DAS PICADAS DE INSETOS EM CÃES (ADAPTADO DE FRITZGERALD & FLOOD, 2006).

Sinais clínicos das picadas de insetos em cães		
Ligeiros	Angioedema ligeiro (< 5 cm diametro); Eritema localizado; Dor ligeira;	
Moderados	Angioedema moderado (> 5 cm <10 cm diametro); Eritema; Urticária; Prurido; Dor intensa;	
Graves (Anafilaxia)	Incontinência urinária; Incontinência fecal; Vômito; Angioedema grave (>10 cm diametro); Fraqueza muscular;	Dispneia; Convulsões; Coma; Morte.

Por último, temos as reações sistêmicas tóxicas que consistem em reações sistêmicas não alérgicas.

As manifestações não alérgicas das picadas por himenópteros são maioritariamente causadas pela toxicidade do veneno e encontram-se normalmente associadas a indivíduos picados várias vezes num curto espaço de tempo, por exemplo por enxames de abelhas, tratando-se de situações bastante raras. Constituem casos isolados e não há evidências, até à data, que apontem para o facto de estas reações serem mediadas por IgE.

Os pacientes que sofrem este tipo de envenenamento tendem, então, a apresentar-se deprimidos e frequentemente febris, muitas vezes sem apresentarem qualquer tipo de edema (excetuando se forem alérgicos). Podem apresentar sinais neurológicos, como ataxia, paralisia facial e convulsões. Apresentam por vezes hematúria, hematemese ou melena. Cowell, Cowell, Tyler e Nieves (1991) descreveram em animais diversas alterações laboratoriais, tais como a elevação da alanina aminotransferase, a elevação dos níveis de bilirrubina e leucograma inflamatório com leucocitose e neutrofilia com predomínio de células jovens. Wysoke, van-den Berg e Marshall (1990) referiram um caso de três cães com hemólise, neuropatia e esferocitose. Waddell e Drobatz (1999) descreveram um caso de dois cães envenenados por picadas de inúmeras *Vespulas spp.*, que se apresentavam à consulta com angioedema, fraqueza, mucosas vermelhas e pulso fraco e que revelaram alterações laboratoriais como leucograma inflamatório (neutrofilia com desvio à esquerda e linfopenia), azotémia, hiperfosfatémia, hipocalcémia, hiperproteinemia, aumento da ALT e níveis de bilirrubina, assim como alterações no perfil de coagulação, entre outras. Mughal *et al.* (2014)

registaram um caso fatal num pastor alemão que apresentava hematúria, hematemesa, descoordenação e convulsões após várias picadas por abelhas de mel.

Até à data e segundo Müller *et al.* (2016), em medicina veterinária não se sabe se as reações anafiláticas à picada por himenópteros são efetivamente imunomediadas ou se são apenas devidas a um elevado grau de envenenamento no cão.

7. Diagnósticos diferenciais

Na maioria dos casos e ao contrário do que sucede nas pessoas, as picadas nos cães não são testemunhadas, sendo por isso muito difícil um dono estar 100% seguro de qual o inseto envolvido na picada. Além disso, os sinais e sua apresentação, em grande parte das ocasiões, são inespecíficos. Como tal, o diagnóstico deve ser baseado não só na história e na suspeita, mas também nos sinais clínicos, assim como nas condições que envolvem o incidente.

Mas outras ocorrências devem igualmente ser consideradas. Diferentes diagnósticos que se podem assemelhar clinicamente às picadas dos insetos podem ir desde infeções, traumatismos, neoplasias, outras alergias, abscessos dentários, corpos estranhos, até reações adversas a medicamentos.

As reações adversas a medicamentos têm sido amplamente referidas e, se medicamentos como a penicilina, ampicilina, tetraciclina, vitamina K, ivermectina, moxidectina, champôs, entre outros (Scott, Miller & Griffin, 2001), têm sido apontados como causadores principalmente de reações urticariformes, as vacinas contra a esgana, parvovirose, hepatite, leptospirose e raiva, podem também provocar angioedema da cabeça (Ohmori *et al.*, 2005a; Ohmori *et al.*, 2005b) e devem, por isso, ser incluídas nos diagnósticos diferenciais. Mais uma vez, a anamnese desempenha aqui um papel fundamental.

Em Portugal, os sinais clínicos provocados pela lagarta do pinheiro (*Thaumetopoea pityocampa*) podem ludibriar os veterinários, sendo por isso necessário incluir também a exposição a este inseto na lista de diagnósticos diferenciais. Assim como a alergia à picada da abelha, a alergia à lagarta do pinheiro pode originar reações urticariformes, angioedema e, em alguns casos, anafilaxia. Por isso, a anamnese desempenha um papel importantíssimo neste tipo de casos (Reedy, Miller & Willemse, 1997; Niza *et al.* 2012; Hill, 2014).

As reações alérgicas ou tóxicas a venenos de outros animais que não os himenópteros deverão sempre ser equacionadas porque, embora sejam menos frequentes, podem ocorrer (Hall, 2009).

8. Diagnóstico de alergia ao veneno dos himenópteros

O diagnóstico de alergia a veneno de himenópteros é baseado na história clínica de picadas, em testes cutâneos positivos e/ou na detecção de IgE para veneno de abelhas de mel e de vespas do género *Vespula* (Hofmann, Pfender, Weckesser, Huss-Marp & Jakob, 2011).

É importante saber identificar a espécie, mas como já referido, apenas em alguns casos isto é possível. É importante referir e recordar que a abelha deixa o ferrão preso à pele após a picada, o que não acontece com as vespas.

Em medicina humana, o diagnóstico de alergia a veneno de himenópteros é apenas usado em pacientes com história de reações sistémicas à picada, tendo como principais objetivos ver o grau de reação e os sintomas associados, identificar a espécie que provoca os sintomas, determinar se a reação é mediada por IgE, definir os fatores de risco adicionais e instituir uma imunoterapia antialérgica específica. (Nitter-Marszalska & Chichocka-Jarosz, 2015).

8.1. Anamnese

A história clínica é, sem dúvida alguma, um dos aspetos fundamentais para um bom diagnóstico de alergia a himenópteros, quer em medicina humana, quer em animais de companhia.

São fundamentais informações como o número e data das picadas, gravidade do problema, lista de sintomas e tipo de reação envolvida, que atividades desempenhava o paciente e a que condições ambientais estava sujeito aquando da picada e ainda quais os tratamentos aplicados, para incluir a picada por himenópteros na lista de diagnósticos diferenciais neste tipo de reações alérgicas (Onbasi, Onbasi, Eminbeyli & Kaynak, 2008).

8.2. Provas cutâneas

As provas cutâneas estão descritas como um dos meios de diagnóstico de eleição para detetar a alergia a himenópteros em pessoas, já que podem ser feitas após a colheita da anamnese e que permitem uma melhor distinção entre a alergia às abelhas e às vespas. Estas provas efectuadas por especialistas têm um custo suportável e apresentam elevada sensibilidade (Incorvaia, Pucci & Pastorello, 1999), como tal, são muitas vezes positivas e relacionam-se bem com a história clínica dos pacientes (Krishna *et al.*, 2011).

No entanto, devemos ter em conta que os resultados positivos, em provas cutâneas e testes serológicos com extratos de venenos convencionais, podem não refletir uma verdadeira sensibilização com implicação clínica. Esses resultados podem por vezes ser causados por

anticorpos de reação cruzada, como as sequências peptídicas homólogas das proteínas alergénicas (hialuronidase e homólogos das dipeptidil peptidase IV) (Blank *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010) ou como os CCDs que são apresentados pela maioria dos venenos de himenópteros (Hemmer *et al.*, 2001; Jappe, Raulf-Heimsoth, Hoffmann, Burow, Hubsch-Müller & Enk, 2006). Contudo, existem autores que referem que as provas cutâneas não são influenciadas pelos CCDs (Sturm *et al.*, 2011). Segundo Boord (2014), 30,0 a 50,0% dos pacientes humanos que têm sensibilidade nas provas cutâneas ao veneno de abelha, também o evidenciam em relação ao veneno de vespa.

Para testar a positividade dupla (DP) contra venenos de abelhas e vespas, em pacientes em que se desconhece o inseto envolvido, são necessários testes laboratoriais adicionais como ensaios de inibição IgE que permitem a distinção entre dupla sensibilidade verdadeira e reações cruzadas (Hofmann *et al.*, 2011). Muitos destes testes, para além de difícil acesso, são dispendiosos, demoram muito tempo e são difíceis de interpretar, sendo raramente usados na clínica.

As provas cutâneas podem ser realizadas por testes epicutâneos ou testes intradérmicos, sendo os testes epicutâneos, segundo artigos de medicina humana, menos sensíveis que os testes intradérmicos (Bjorkander & Belin, 1980 citado por Biló *et al.*, 2005). Também de acordo com a literatura, recomenda-se a realização das provas cutâneas pelo menos duas semanas (idealmente 4 a 6 semanas) após a reação à picada para evitar a possibilidade de falsos negativos durante o período refratário (Müller, 1990 citado por Biló *et al.*, 2005). Nos casos em que a história clínica evidencia uma reação sistémica à picada e em que as provas cutâneas sejam negativas, é necessário repetir os testes passados 1 a 2 meses, dado que a duração do período refratário pode ser maior que duas semanas (Biló *et al.*, 2005).

A especificidade das provas cutâneas com veneno de himenópteros é muito difícil de definir, porque pacientes expostos que nunca desenvolveram uma reação sistémica podem ter sido sensibilizados na última picada, ou a sensibilização pode não ter tradução clínica (Biló *et al.*, 2005).

Em medicina veterinária, os únicos protocolos relativos a provas intradérmicas para veneno de himenópteros, até à data, são experimentais. Na pesquisa bibliográfica foram encontrados dois resumos em ata de congresso sobre este tema. Primeiro, num resumo norte americano (Boord, Griffin & Rosenkrantz, 2005), concluiu-se que as provas cutâneas podem ser realizadas com segurança e que a imunoterapia diminui efetivamente a positividade das reações. Segundo, num resumo australiano mais recente (Bryden, 2009), apresentou-se um protocolo experimental em que foram realizados testes intradérmicos em diversos animais e

imunoterapia específica. Contudo, os autores do presente trabalho não conseguiram acesso aos resultados dos testes.

Estes testes não são prática comum em medicina veterinária e isso até se constata no facto de os principais laboratórios de alérgenos para animais (ALK-Artuvetrin[®], Greer[®]) não possuírem alérgenos comerciais para uso em medicina veterinária.

A bibliografia mais antiga revela que as provas cutâneas com veneno de himenópteros em medicina humana devem ser realizadas individualmente, uma a uma, mantendo intervalos de 15 a 20 minutos entre injeções (Biló *et al.*, 2005; Golden, 2011). Contudo, num estudo realizado recentemente (Stohmeier, Aberer, Bokanovic, Komericki & Sturm, 2013), além de controlos positivo e negativo, foram administradas concentrações de veneno simultâneas na pele (primeiro, 0.02ml de 0.001, 0.01, 0.1 e 1.0 µg/ml de veneno de abelha; e numa segunda fase, as mesmas concentrações de veneno de vespa), sendo que estas eram positivas na presença de um halo eritematoso de diâmetro ≥ 5 mm. Este novo método de administração possibilita a realização dos testes de uma maneira mais célere e menos dispendiosa, o que na medicina veterinária pode ser uma vantagem significativa.

8.3. Testes *in vitro*

Embora eficaz, a serologia por si só pode subdiagnosticar ou identificar erradamente a espécie envolvida na picada. Para melhores resultados, é sempre essencial a história clínica do paciente e o resultado dos testes intradérmicos.

8.3.1. Alérgenos IgG específicas

Os níveis das IgG específicas refletem principalmente a exposição e diminuem mais rapidamente que as IgE específicas (Mosbech, Christensen, Dirksen & Söborg, 1986 citado por Biló *et al.*, 2005). As IgG específicas contra o veneno aumentam após picada e não estão relacionadas com a presença ou ausência de uma reação alérgica à picada. (Müller, 1990 citado por Biló *et al.*, 2005)

8.3.2. Alérgenos IgE específicos

O teste mais utilizado em medicina humana para detetar alérgenos IgE específicos era, até há 25 anos atrás, o teste RAST (*Radio Allergo Sorbent Test*). Existem múltiplas derivações deste teste, sendo que os testes mais recentes eram também os mais sensíveis (Jeep, Kircholf, O'Connor & Kunkel, 1992). Boyce *et al.* (2010) referiram num artigo recente, que o nome

RAST deveria ser abandonado, dado que estes testes foram substituídos por ensaios de fluorescência, com maior sensibilidade e especificidade.

Tal como nas provas cutâneas, nos primeiros dias após a picada, as IgE específicas do veneno podem estar baixas ou não detetáveis, vindo posteriormente a aumentar nas semanas após a picada. A descida das IgE específicas ocorre lentamente no tempo e tem uma grande variação individual (Goldberg & Confino-Cohen, 1997). Tal como referido para os testes cutâneos, as determinações séricas devem ser repetidas passadas algumas semanas, em pacientes com histórias e sinais clínicos compatíveis mas em que não foram inicialmente detetadas IgE específicas (Goldberg & Confino-Cohen, 1997).

A dupla positividade deste teste para abelhas e vespas ocorre em 30,0% ou mais dos pacientes humanos, podendo o paciente ser alérgico apenas a um dos insetos e sendo a dupla positividade consequência da reação cruzada dos venenos (Krishna *et al.*, 2011), principalmente pela reatividade das IgE aos CCDs (Spillner, Blank & Jakob, 2014). As provas cutâneas podem ajudar na distinção, dado que a dupla positividade nestas é menos comum.

O melhor método para diagnosticar a alergia à picada de himenópteros, disponível no mercado até à data deste estudo, e que permite uma melhor distinção entre dupla sensibilização ou reação cruzada é o uso de alérgenos recombinantes específicos de espécie para veneno de abelhas (rApi m1) e para veneno de vespas (rVes v5), desprovidos de reações a CCD num ensaio fase-sólida ImmunoCAP® (Hofmann *et al.*, 2011). É considerado o *gold standard* nos estudos de IgE *in vitro* (Wood, Segall, Ahlstedt & Williams, 2007).

Segundo Müller, Johansen, Petersen, Fromberg-Nielsen e Hachberli (2009), mais de 50% dos pacientes humanos com reações alérgicas sistémicas a picadas de himenópteros apresenta anticorpos IgE específicos contra venenos de abelhas (*Apis mellifera*) e vespas (*Vespula ssp.*), possivelmente causados pela reação cruzada ou pela dupla sensibilização (Müller, Schmid-Grendelmeier, Hausmann & Helbling, 2012). A distinção entre as duas possibilidades é importante com vista à seleção do veneno correto para imunoterapia específica (Biló, 2011).

O ImmunoCAP® constitui uma tecnologia que se baseia na capacidade extremamente elevada de ligação total, adquirida através da capacidade de ligação de celulose por mg, em associação com uma quantidade otimizada de celulose em fase sólida. Independentemente da afinidade dos anticorpos, é assegurada a ligação de todos os anticorpos relevantes, mesmo de todos aqueles que têm ligações não específicas baixas (TFS, 2012). O ImmunoCAP® contém uma fase sólida composta por um derivado de celulose fechado numa cápsula. Trata-se de um microambiente ideal para a ligação irreversível de alérgenos, mantendo-se a estrutura nativa, na medida em que o polímero constituinte é hidrófilo e muito ramificado. O teste é realizado

como um imunoensaio em “sanduíche”, em que, numa primeira fase, o alergénio, o componente alergénico ou uma mistura equilibrada de alergénios, reagem com a IgE específica na amostra de soro do animal alérgico, acoplando-se por ligação covalente à fase sólida. Numa segunda fase, realiza-se uma lavagem e são adicionados anticorpos marcados por uma enzima contra a IgE para formarem um complexo. Depois da incubação, a anti-IgE não ligada marcada por enzima é lavada e o complexo ligado volta a ser incubado com o substrato. Por fim, quando cessa a reação, procede-se à medição da fluorescência do eluído, sendo esta diretamente proporcional à concentração de IgE específica na amostra de soro (TFS, 2012).

Como foi referido anteriormente, este método de diagnóstico permitiu um avanço significativo na distinção entre reação cruzada e dupla sensibilização. Os componentes alérgicos do veneno disponíveis até ao momento, Api m1, Ves v1 e Ves v5, permitem diagnosticar positivamente pacientes alérgicos ao veneno de himenópteros com uma precisão de 95,0% para as vespas e de 63,0% para as abelhas (Nitter-Marszalska & Chichocka-Jarosz, 2015). Novos componentes alérgicos, como Api m3 e Api m10, vão estar disponíveis no mercado em breve, com o objetivo de aumentar para 87,5% a sensibilidade do diagnóstico de abelhas (Nitter-Marszalska & Chichocka-Jarosz, 2015).

De acordo com um estudo realizado por Cifuentes *et al.* (2014), foi pela primeira vez demonstrado que a combinação de antigénios recombinantes pode aumentar a sensibilidade do ImmunoCAP® ao extrato de veneno, tendo-se demonstrado, contrariamente a outros estudos anteriores, a importância de alergénios de pequena dimensão no diagnóstico da doença alérgica. Assim, a deteção de IgE específicas, num painel de alergénios recombinantes do veneno, melhora a avaliação diagnóstica na alergia à picada de himenópteros.

Em suma, a deteção por CAP tem uma sensibilidade maior que as provas cutâneas, e esta sensibilidade dos testes tem vindo a aumentar cada vez mais principalmente para as abelhas (Nitter-Marszalska & Chichocka-Jarosz, 2015). Ainda, segundo outro estudo (Ebo *et al.*, 2007), a sensibilidade e a especificidade são mais elevadas no que respeita aos testes intradérmicos, e por isso podem ser muito úteis para o estudo da dupla reatividade. Estas provas poderão vir a ser, num futuro próximo, o melhor e o mais usado teste de diagnóstico, quer em medicina humana, quer em medicina veterinária.

8.3.3. Outros testes *in vitro*

Estes testes são na sua maioria utilizados apenas quando as provas cutâneas ou as medições de anticorpos IgE específicos no soro apresentam resultados negativos, apesar do paciente ter uma reação sistémica anafilática à picada (Zollner *et al.*, 2001 citado por Biló *et al.*, 2005;

Przybilla, Ring & Wielgosch, 1988 citados por Biló *et al.*, 2005). Estas provas *in vitro* também são úteis em casos de multipositividade.

Entre os testes mais utilizados estão o *Western immunoblotting*, o teste de libertação de histamina (HRT), o teste de estimulação antigénica celular (CAST), ou utilização de citometria de fluxo (FlowCAST®) na deteção de marcadores de ativação na superfície celular dos basófilos, também conhecido por teste de ativação de basófilos (BAT).

As capacidades do *Western blot* têm sido muito estudadas nesta área. Os venenos, constituídos por uma mistura complexa de proteínas, podem ser separados electroforéticamente por SD-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose. (Tavares, 2005). O padrão de anticorpos específicos de cada indivíduo é demonstrado a partir da incubação desta matriz com soro do doente e posteriormente com anticorpo monoclonal anti-IgE, anti-IgG ou outro marcado com enzima, por exemplo a fosfatase alcalina, que reagem com uma substância cromogénia. Realiza-se um *scanning* e uma avaliação por meio de densitometria (Tavares, 2005). Um estudo demonstrou que a sensibilidade e especificidade obtidas a partir deste teste eram superiores às provas cutâneas (Zollner *et al.*, 2001).

No CAST, os leucócitos sanguíneos pré-estimulados com Interleucinas-3 (IL-3) são expostos a alergénios do veneno e a libertação de sulfidoleucotrienos é determinada por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Maly, Marti-Wyss, Blumer, Cuhat-Stark & Wüthrich, 1997).

No HRT, os leucócitos do sangue periférico são encubados com alergénios do veneno, resultando na agregação de anticorpos IgE e células. Por conseguinte, as células, maioritariamente basófilos, são estimuladas a libertar histamina (Radermecker, Leclercq, Mariz & Louis, 1993).

O BAT ou FlowCAST® consiste na quantificação de basófilos ativados por citometria de fluxo. Atualmente, o marcador mais comum para demonstrar a ativação dos basófilos pela alergia é o CD63 (Sainte-Laudy, Sabbah, Drouet, Lauret & Loiry, 2000), sendo também utilizado o CCR3 (Eberlein *et al.*, 2010).

Grande parte destes testes só pode ser realizada por laboratórios especializados, dadas as suas especificidades técnicas e o seu elevado custo, não podendo os testes de diferentes laboratórios ser comparados porque não são normalizados.

8.4. Erros no diagnóstico

Na alergia à picada por himenópteros, são vários os erros que surgem no diagnóstico e, mesmo que os testes sejam realizados com o maior dos cuidados e rigor, eles são bastante frequentes e

têm distintas origens. Como não se realizam estes testes de diagnóstico por rotina em veterinária, os erros identificados são sobretudo relativos à medicina humana (Krishna *et al.*, 2011).

A identificação do inseto por parte do paciente é um dos erros de diagnóstico mais frequentes em medicina humana. Muitas vezes, o paciente afirma que o agente envolvido foi uma vespa, quando de facto se tratou de uma abelha de mel. Para agravar esta situação, os testes de diagnóstico, dada a sua forte reação cruzada, conduzem frequentemente a uma identificação incorreta do agente causal, podendo comprovar a suspeita inicial do paciente, embora esta seja, na verdade, falaciosa. Este erro de diagnóstico só é identificado, quando se constata, numa fase posterior, que o paciente não reage à imunoterapia específica prescrita, por o agente causal ter sido mal identificado, apesar dos testes e da história clínica serem compatíveis com o agente apresentado inicialmente. A avaliação *in vitro* é por isso cada vez mais relevante.

Em medicina veterinária torna-se ainda mais difícil a identificação, dado que grande parte das picadas não é presenciada pelos donos.

Outro dos erros frequentes e associado ao anterior é a dupla positividade associada a uma reação cruzada entre os dois grupos de venenos (Krishna *et al.*, 2011). Muitos pacientes apresentam resultados positivos à alergia para os dois grupos, sendo contudo alérgicos a apenas um. As provas cutâneas podem ajudar à distinção em algumas destas situações e o melhor método para fazer a distinção é a avaliação serológica (Müller, Schmid-Grendelmeier, Hausmann & Helbling, 2012).

Ainda outro dos erros possíveis relaciona-se com a dificuldade em interpretar os testes intradérmicos, já que estes podem apresentar uma reação pouco exuberante ou então serem positivos apenas em concentrações mais elevadas.

Os testes intradérmicos podem ainda dar resultados negativos em pacientes com história de terem sido picados e tido algum tipo de reação, pela perda da sensibilização após uma reação muito espaçada no tempo. Os testes também podem dar negativos se forem realizados no período refratário. (Golden, 2007)

Por último, outro erro relaciona-se com os falsos negativos dos testes que doseiam as IgE-específicas no soro. Num grupo de pacientes com IgE-específicas negativas no soro e testes *prick* negativos, mas com sinais sistémicos, foi possível demonstrar que 75,0% eram positivos, quando as IgE foram estudadas por *immunoblotting* (Krishna *et al.*, 2011).

9. Maneio

9.1. Principais tratamentos

A maioria dos casos de picadas de himenópteros é auto-limitada, resolvendo-se em poucas horas sem qualquer tipo de tratamento (Miller, Griffin & Campbell, 2013).

Nos casos de picadas não complicadas, o tratamento utilizado consiste numa terapêutica conservadora com aplicação de gelo ou compressas frias, lidocaína tópica e pomadas de cortisona para diminuir o edema e o desconforto (Miller *et al.*, 2013). Diversas fontes bibliográficas sugerem os anti-histamínicos, sendo a difenidramina um dos mais utilizados com eficácia na dose 2-4 mg/kg (Cowell & Cowell, 1995). Contudo, outros autores dizem que estes possuem eficácia limitada no controlo de doenças de hipersensibilidade nos animais (Tizard, 2013a; Olivry *et al.*, 2015). Todos os animais picados devem ser observados e monitorizados após picada, dado que as reações anafiláticas progridem rapidamente e podem ser fatais.

Em casos mais graves, como nas situações de angioedema grave, o maneio clínico efetivo consiste na terapêutica com doses anti-inflamatórias de glucocorticoides (prednisolona), 1mg/kg de 24 em 24 horas, até a situação estar controlada (3 a 7 dias), podendo ser seguida de uma terapêutica em dias alternados (Miller *et al.*, 2013).

De acordo com Dhupa (2005), publicado pelo Serviço de Informação Internacional Veterinária (IVIS), nos casos de anafilaxia aguda, deve ser administrada rapidamente, por via intramuscular (via ideal), sublingual, endotraqueal ou subcutânea, adrenalina (epinefrina) 1:1000 (0,01 mg ou mL/kg) a cada 15 a 20 minutos. Se for uma reação grave, deve ser administrada adrenalina 1:10000 (0,1 mL/kg) por via intravenosa (IV), monitorizando-se a pressão sanguínea, o ritmo e a frequência cardíaca (preparada com 1 mL de adrenalina na concentração 1:1000(1mg/mL), diluída em 9mL de NaCl).

Devem manter-se as vias aéreas permeáveis (se necessário entubar e administrar oxigénio) e deve fazer-se fluidoterapia com cristalóides (90mL/kg em cão) para prevenir o colapso vascular, exceto se existir edema pulmonar. Anti-histamínicos (difenidramina na dose 0,5-2 mg/kg IM a cada 8 horas) e corticosteróides (prednisolona a 8-15 mg/kg IV) poderão ser necessários.

O melhor tratamento é a prevenção, ou seja, evitar que os cães com reações graves sejam picados. Contudo, dada a sua curiosidade e sendo os himenópteros um vetor pouco controlável, a imunoterapia específica com alérgenos surge como uma possibilidade muito válida para o tratamento de cães com manifestações sistémicas e que tenham maior exposição.

9.2. Prevenção

Cada vez se torna mais evidente que o ambiente e o estilo de vida dos animais influenciam a sua predisposição para as alergias. Atualmente também se sabe que o desenvolvimento da alergia não está exclusivamente dependente de fatores genéticos. O contacto com os potenciais alergénios é importante para permitir a sensibilização e consequente hipersensibilidade aos mesmos (Hill, 2014). Sabe-se também que, quer os seres humanos, quer os animais de companhia são cada vez mais sensíveis a manifestações de alergias.

A prevenção é, por isso, algo realmente importante para minimizar a exposição, neste caso concreto, às picadas futuras. Neste aspeto é essencial fazer a distinção entre pessoas e animais. As *guidelines* propostos pela BSACI apresentam algumas medidas que podem ser tomadas para prevenir as picadas em pessoas. Relativamente ao proposto para cães, são apresentadas algumas medidas por Fitzgerald e Flood (2006) e por outros autores (Cowell & Cowell, 1995; Bonifazi, Jutel, Biló, Birnbaum & Müller, 2005; Fitzgerald, 2013) e considerando aquelas propostas no BSACI, podemos concluir que é proposto essencialmente:

1. Evitar usar champôs com cheiro intenso, dado que as abelhas são atraídas por fragrâncias fortes (Fitzgerald, 2013);
2. Evitar deixar a ração no comedouro ao ar livre (Fitzgerald & Flood, 2006);
3. Evitar ter o cão junto de fontes de água (ex: torneiras, piscinas, sistema de rega; exceção feita ao próprio bebedouro) (Krishna *et al.*, 2011).
4. Evitar, se possível, espaços com maior prevalência de himenópteros, por exemplo, jardins com flores (Fitzgerald & Flood, 2006);
5. Evitar ter depósitos de lixo junto da habitação do canídeo, assim como latas de alumínio abertas no exterior (Fitzgerald & Flood, 2006);
6. Evitar ter as paredes pintadas de cores escuras, fortes, dado que as abelhas são atraídas por essas cores (Fitzgerald, 2013);
7. Evitar ter fruta caída no chão, no caso de existirem árvores de fruta no jardim (Fitzgerald & Flood, 2006; Bonifazi *et al.*, 2005);
8. As abelhas libertam feromonas com um odor semelhante a bananas descascadas, graças ao acetato de isopentilo encontrado, quer nas feromonas, quer nas bananas. Este odor serve de alarme para outras abelhas saberem onde deverão atacar, e como tal, no caso de refeições ao ar livre, em que um canídeo esteja presente, as bananas devem ser guardadas com especial cuidado (Fitzgerald, 2013);

9. Manter os cães longe das colmeias e trocar de vestuário antes de entrar em casa para manter as abelhas no exterior da habitação, no caso específico de apicultores (Krishna *et al.*, 2011; Bonifazi *et al.*, 2005);

10. Manter o pelo comprido, já que uma pelagem densa pode prevenir mais a picada (Cowell & Cowell, 1995);

11. Manter o canídeo longe do quintal enquanto se faz jardinagem (mais concretamente corte de arbustos e de flores) (Bonifazi *et al.*, 2005).

Além de todas as medidas atrás mencionadas, o proprietário de um animal sensibilizado deverá, não só ter conhecimento de como reagir, como também conhecer um plano de medicação de urgência a utilizar em caso de picada pelo himenóptero. A medicação de urgência poderá incluir o uso de anti-histamícos (cetirizina PO ou Prometazina IM) (Bonifazi *et al.*, 2005) e/ou o uso de uma injeção de adrenalina IM (adaptado de medicina humana por ex: Anapen[®] 500µg para cães com mais de 46kg; Anapen[®] ou Epipen[®] 300µg para cães 26-45kg; Anapen Júnior[®] ou Epipen[®] 150µg para cães 10-25 kg encontrando-se disponíveis no mercado nacional) (Rodrigues & Ribeiro, 2013).

9.3. Imunoterapia

A imunoterapia é o único tratamento específico para a picada de himenópteros com história de reações sistémicas em pessoas.

Diversos estudos em medicina humana comprovam a eficácia da imunoterapia na redução do risco de anafilaxia a abelhas de mel, vespas e *Polistes* (Cox *et al.*, 2011).

Existem diversos laboratórios que fornecem extratos alergénicos para imunoterapia específica com veneno de himenópteros (ITV). Como existe uma forte reação cruzada dentro das famílias de himenópteros, quer da família Vespidea, quer da família Apidae, os alergénios usados são os mesmos.

Em medicina veterinária, estes alergénios, até à data, não se encontram disponíveis nos principais laboratórios de alergénios veterinários (ALK-Artuvetrin[®], Greer[®]), quer destinados a imunoterapia, quer a provas cutâneas, embora os mesmos existam em vários laboratórios de medicina humana.

9.4. Prognóstico

Globalmente podemos considerar que o prognóstico das vítimas de picadas de himenópteros é excelente, uma vez que a grande maioria dos cães picados não é alérgica e, como tal, as situações são autolimitadas, resolvendo-se sem qualquer tipo de tratamento, passadas algumas

horas. A maioria das vítimas fatais são animais que desenvolvem reações alérgicas de anafilaxia, tratando-se felizmente de casos que provavelmente serão pontuais e que podem conduzir ao óbito em poucas horas. Como já foi referido anteriormente, se a reação anafilática não ocorrer nos primeiros 30 minutos após a picada, é pouco provável que ocorra (Frazier, 1976). Por isso, para que o prognóstico seja favorável, estes animais devem ser tratados com a maior celeridade possível e é fundamental que o diagnóstico seja efetuado.

Apesar da dor, edema e, por vezes, reações sistêmicas mais graves, muitos cães, dada sua curiosidade natural e instinto de caçador, acabam por ser picados múltiplas vezes ao longo dos anos da sua vida.

10. Imunoterapia

A imunoterapia específica com veneno de himenópteros (ITV) é considerada atualmente a única abordagem terapêutica pela qual é possível atingir tolerância a longo prazo, sendo uma das imunoterapias específicas mais eficazes (Lang & Hawranek, 2006).

10.1. Mecanismos de ação

O princípio básico da resposta humoral induzida pela imunoterapia antialérgica assenta na produção de IgG, traduzindo-se pela produção de anticorpos bloqueadores que reduzem o recrutamento de células inflamatórias, quando expostas aos alérgenos do veneno (Tizard, 2013a).

Embora a ITV seja a única terapêutica capaz de induzir tolerância a este tipo de alérgenos, os seus mecanismos imunopatológicos envolvidos ainda estão por clarificar (Alves *et al.*, 2008).

Porém, são conhecidas e foram descritas diversas alterações imunológicas durante este processo. Segundo Tizard (2013a), a dessensibilização induz um desvio de resposta celular auxiliar dominante de Th2 para Th1. Há um aumento de interferão gama (IFN- γ) que bloqueia a síntese de anticorpos IgE pela IL-4 das células Th2. As mudanças na produção de citocinas promovem o desvio de IgE para IgG, levando ao aumento significativo da IgG₄ (“bloqueadores de alérgenos”) específica (Tomé, Reis, Guedes, Saraiva & Teixeira, 2009).

Tizard (2013a) diz também que a dessensibilização ativa linfócitos T CD8 que conduzem à produção de IL-12 e IL-18 por parte das células dendríticas, promovendo a resposta Th1.

Segundo Tizard (2013a), os linfócitos T reguladores produzem IL-10 que inibem a produção de IgE, levam à ativação de mastócitos e à libertação de histamina e leucotrienos, quando o animal é dessensibilizado. A IL-10 é uma citocina reguladora das respostas inflamatórias e supressora de respostas celulares T específicas de alérgeno (Akdis, Blesken, Akdis, Wuthrich & Blaser, 1998).

Outras alterações mais recentemente descritas e que podem permitir uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos incluem, não só o aumento progressivo, no sangue periférico, de células T reguladoras, principalmente células $CD4^+CD25^{bright}$ (Alves *et al.*, 2008), como também a diminuição da expressão de CD63 nos basófilos (Tomé *et al.*, 2009), e ainda a redução do número e estado de ativação dos basófilos (Alves *et al.*, 2008).

Pensa-se que os mecanismos da imunoterapia no cão serão semelhantes aos existentes nas pessoas (Müller, 2015).

10.2. Indicações para imunoterapia

Em medicina humana, a ITV é recomendada para todos os pacientes com reações sistêmicas graves e para alguns casos de reações sistêmicas moderadas (Krishna *et al.*, 2011; Bonifazi *et al.*, 2005). Também é recomendada para indivíduos que estejam sujeitos a fatores de risco. A ITV não se encontra recomendada para pacientes que tenham provas cutâneas e/ou testes específicos de IgE negativos e também não se encontra recomendada em pessoas com reações localizadas de pequena dimensão (Krishna *et al.*, 2011, Bonifazi *et al.*, 2005). As restantes reações devem ser avaliadas, considerando a exposição aos fatores de risco e tendo em conta que cada caso é um caso.

Em medicina veterinária podemos estabelecer também alguns requisitos necessários, tendo em consideração aquilo que se faz em medicina humana. Como tal, segundo os autores do presente trabalho os candidatos mais prováveis à ITV serão cães com reações sistêmicas graves ou moderadas e que tenham exposição aos fatores de risco. Cães alérgicos à picada por himenópteros e com idade jovem, e/ou cães de apicultores ou caçadores, e/ou cães de exterior de climas mais quentes, e/ou cães que habitem longe de clínicas ou hospitais veterinários são os melhores candidatos à ITV. Esta imunoterapia pode também ser aconselhada a proprietários que queiram melhorar a qualidade de vida de animais que tenham tido manifestações clínicas, prevenindo futuras reações alérgicas.

10.3. Protocolos de imunoterapia

10.3.1. Seres humanos

Existem diversos protocolos de imunoterapia em medicina humana, tendo eles muitas variações entre si (Sturm, Kränke, Rudolph & Aberer, 2002). Segundo Sturm *et al.* (2002), os protocolos incluem a imunoterapia convencional (doses crescentes por intervalo semanais), o *rush* (fase de indução em 4-7 dias), o *ultrarush* (a dose de manutenção é alcançada em 1-2 dias), ou o *cluster* (um

rush modificado que consiste em realizar várias injeções em intervalos de 15-30 minutos, durante as primeiras visitas, e alcança a dose de manutenção em cerca de 6 semanas). Os protocolos *rush* e *ultrarush* são os mais eficazes e os mais utilizados em medicina humana, permitindo chegar rapidamente à dose de manutenção (geralmente de 100 µg) e conferindo uma proteção imediata muito significativa (Sturm *et al.*, 2002). As doses de manutenção são repetidas a intervalos de 4/4 semanas no primeiro ano de tratamento e posteriormente a intervalos de 6/6 a 8/8 semanas.

10.3.2. Veterinária

A imunoterapia específica com veneno de himenópteros quase não é utilizada em veterinária e, como tal, os protocolos que estão descritos são apenas experimentais, sendo poucas as referências disponíveis. Em 2005 (Boord, Griffin & Rosenkrantz, 2005) foi apresentado o primeiro estudo piloto com vista a determinar a utilidade dos testes intradérmicos com veneno, fazer imunoterapia, avaliar a resposta à ITV e constatar possíveis efeitos secundários. Relativamente à imunoterapia, para os cães positivos ao teste intradérmico, o protocolo usado foi semanal, tendo-se utilizado três diferentes concentrações, com aumentos graduais de 0,05mL e duração de 15 semanas. O protocolo usado encontra-se descrito na tabela 5. Este protocolo foi baseado numa ITV usada em medicina humana.

TABELA 5. PROTOCOLO IMUNOTERAPIA PARA VENENO DE HIMENÓPTEROS (BOORD, GRIFFIN & ROSENKRANTZ, 2005).

Concentração do alergénio					
1 µg/mL		10 µg /mL		100 µg /mL	
Semana	Dose (mL)	Semana	Dose (mL)	Semana	Dose (mL)
1º	0.05	5º	0.05	9º	0.05
2º	0.10	6º	0.10	10º	0.10
3º	0.20	7º	0.20	11º	0.20
4º	0.40	8º	0.40	12º	0.40
				13º	0.6
				14º	0.8
				15º	1.00

No artigo de Bryden (2009), o protocolo foi semelhante ao do estudo anterior.

Contudo, após 15 semanas, a ITV foi continuada com uma injeção de manutenção que continha 1mL de 100 µg/mL de veneno (100 µg) e feita mensalmente. Neste estudo não se concluiu nada sobre a duração ideal da imunoterapia, porém, demonstrou-se que, em alguns dos pacientes, as posteriores reações às picadas foram de menor intensidade.

10.4. Efeitos da imunoterapia

Em medicina humana, os resultados da imunoterapia para himenópteros são bastante motivadores. Diversos estudos realizados em pacientes humanos sugerem que a imunoterapia previne as reações sistêmicas em 75,0 a 95,0% dos pacientes que são picados novamente (Golden, Kagey-Sobotka & Lichtenstein, 2000 citado por Sturm *et al.*, 2002; Müller, Berchtold & Helbling, 1991 citados por Sturm *et al.* 2002; van Halteren, van der Linden, Burgers & Bartelink, 1997 citados por Sturm *et al.*, 2002; Przybilla & Ruëff, 2010; Hunt *et al.*, 1978 citado por Krishna *et al.*, 2011; Müller, Thurnheer, Patrizzi, Spiess & Hoigne, 1979 citado por Krishna *et al.*, 2011; Müller & Ring, 2015).

Num estudo realizado por Oude Elberink, van der Heide, Guyatt e Dubois (2009), concluiu-se que a qualidade de vida é melhor em indivíduos que fazem ITV do que naqueles que apenas usam autoinjetores de adrenalina.

Em medicina veterinária, a imunoterapia específica para a dermatite atópica está a ser largamente utilizada e, de acordo com Müller (2015), nos estudos publicados, 50,0 a 75,0% dos casos têm tido excelente resposta à imunoterapia quando adicionada à medicação e, em 20,0% dos cães, esta resposta consegue-se apenas com a imunoterapia.

Relativamente à imunoterapia específica com veneno de himenópteros, a que tem sido utilizada tem atingido boas taxas de sucesso (Boord, Griffin & Rosenkrantz, 2005; Bryden 2009). No estudo realizado por Bryden (2009) concluiu-se que é possível reduzir ou mesmo prevenir futuras reações anafiláticas à picada por himenópteros. Mais estudos deverão ser realizados para averiguar a eficácia da ITV em cães.

10.5. Outros protocolos

10.5.1. Pré-medicação com anti-histamínicos

Num estudo realizado por Reimers, Hari e Müller (2000), comprova-se que uma pré-medicação com anti-histamínicos, antes de uma imunoterapia por *rush* ou *ultrarush* em pacientes humanos, tende a reduzir as reações locais e as reações generalizadas de urticária e angioedema. Pode, por isso, ser usada em pacientes que exibam sinais alérgicos quando fazem ITV.

Nos canídeos, sabe-se que os anti-histamínicos têm uma eficácia duvidosa principalmente na atopia canina (Cook *et al.*, 2004; Miller, Griffin & Campbell, 2013; Olivry *et al.*, 2015). Contudo, de acordo com Reedy, Miller e Willemse (1997), os anti-histamínicos são eficazes na prevenção de novas lesões urticariformes, de angioedema ou anafilaxia, ainda que não tenham qualquer tipo de efeito nas lesões existentes. Existem ainda estudos recentes que

comprovam a eficácia de alguns anti-histamínicos para tratamento de urticária e angioedema, como o uso de maleato de mepiramina (Cingi, Ural, Acar & Uzlu, 2010). Assim, a pré-medicação com anti-histamínicos, em cães que exibam sinais alérgicos à ITV, pode ser uma solução, embora, pela experiência da sua utilização, não seja muito utilizada.

10.5.2. Relação com β -bloqueadores

Em medicina humana existe grande preocupação com a relação entre os β -bloqueadores e a ITV. Os β -bloqueadores inibem alguns dos efeitos da adrenalina, quer endógena, quer exógena e, como tal, o tratamento pode tornar-se ineficaz em caso de anafilaxia (Toogood, 1987). Deste modo, deve ponderar-se a interrupção do tratamento com β -bloqueadores com a sua substituição por outros fármacos antes de iniciar a ITV. Um estudo mais recente (Müller & Haeberli, 2005) refere que a combinação dos β -bloqueadores com a ITV poderá estar indicada em indivíduos de alta exposição ao veneno e com doença cardiovascular grave.

Embora não tenham sido encontrados estudos realizados em cães que relacionem a ITV com os β -bloqueadores, os autores consideram que as preocupações e precauções a tomar deverão ser as mesmas.

10.5.3. Relação com inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECAs)

Apesar da preocupação inicial, motivada pela existência de casos referidos em medicina humana, relacionando a existência de reações anafiláticas em pacientes que faziam imunoterapia e usavam concomitantemente IECAs (Ober, MacLean & Hannaway, 2003), estudos recentemente publicados por White e England (2008) e Stoevesandt, Hain, Stolze, Kerstan e Trautmann (2014) concluíram que não existe associação entre o uso de IECAs e o aumento da frequência de reações sistémicas à ITV.

Mais uma vez, não foram encontrados casos descritos relativos a cães.

10.5.4. Mastocitose

Em pacientes humanos com mastocitose e alergia ao veneno de himenópteros é recomendado que as injeções sejam feitas com supervisão médica rigorosa e tendo sempre à disposição um *kit* rápido de emergência (Bonadonna, Zanotti & Müller, 2010). Nestes casos concretos, a ITV deve ser efetuada durante toda a vida (Bonadonna, Zanotti & Müller, 2010). Mais uma vez, até à data não foram encontrados casos descritos relativos a cães.

10.6. Aspectos práticos da imunoterapia

A duração da ITV, em pacientes humanos, foi inicialmente proposta como sendo um tratamento para levar a cabo ao longo de toda a vida ou, pelo menos, até que as provas cutâneas ou as provas IgE específicas se apresentassem negativas. Ainda assim, graças a vários estudos realizados entre 1985 e 1998, concluiu-se que mais de 80% dos pacientes se encontram protegidos até 7 anos após conclusão da ITV de duração entre 3 a 5 anos (Urbanek, Forster, Kuhn & Ziupa, 1985 citados por Bonifazi *et al.*, 2005; Lerch & Müller, 1998 citados por Bonifazi *et al.*, 2005; Golden *et al.*, 1989 citados por Bonifazi *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 1991 citados por Bonifazi *et al.*, 2005; van Halteren *et al.*, 1997 citados por Bonifazi *et al.*, 2005). Atualmente, pensa-se que a ITV deve ser realizada, em pacientes humanos, por um período mínimo de 3 a 5 anos (Müller & Ring, 2015).

Müller e Ring (2015) afirmam que, quando se pensa em suspender a ITV, se deverá repetir os testes de diagnóstico. Contudo na prática clínica muitas vezes os protocolos são apenas suspender ao fim de alguns anos e os animais vigiados para recidivas (Martins 2010).

Vários são os fatores que podem influenciar a eficácia da imunoterapia, tais como a idade do paciente (a eficácia diminui com a idade), o tipo de veneno (o de abelha é menos eficaz), a duração da imunoterapia ou até o elevado nível de triptase sérica ou a existência de mastocitose.

De acordo com Müller e Ring (2015), deve ainda ser considerada uma imunoterapia por tempo indeterminado nos seguintes casos: em pacientes humanos que tenham sinais sistêmicos graves; em pacientes que estejam altamente predispostos às picadas devido ao seu trabalho ou às suas atividades de lazer; em pacientes que habitam em áreas de apicultura; em pacientes que apresentem doenças cardíacas e/ou pulmonares graves; em pacientes que apresentem reações adversas à ITV ou reações sistêmicas quando picados novamente durante a ITV; em pacientes submetidos a doses de veneno mais altas para criar proteção; e ainda em pacientes com mastocitose ou níveis elevados de triptase sérica.

Em medicina veterinária, no estudo de Bryden (2009), nada se concluiu sobre a duração ideal da imunoterapia.

A ITV não é 100% eficaz e, como tal, pode surgir uma reação sistêmica num paciente que parou a ITV (Müller & Ring, 2015), sendo para isso necessário ter medicação de emergência e ter cuidados com a prevenção.

11. Investigações futuras

Em medicina humana, cada vez mais se estudam a influência das picadas de himenópteros em pessoas alérgicas e o uso da imunoterapia como tratamento eficaz para prevenir as reações

adversas. Embora existam inúmeros estudos publicados sobre este tema, todos os dias se encontram novos conhecimentos sobre o veneno de abelhas e vespas, sobre a aplicabilidade destes na evolução da medicina (por exemplo, venenos com propriedades anticancerígenas (Leite, Aufderhorst-Roberts, Palma, Connell, Neto & Beales, 2015), sobre novos testes de diagnóstico e sobre novas formas de realizar imunoterapia de maneira mais eficaz e prática.

Em medicina veterinária, esta área encontra-se pouco estudada e, como tal, existe todo um universo a explorar, usando-se como base grande parte dos conhecimentos que a medicina humana pode fornecer.

Muito pode evoluir, quer do ponto de vista do diagnóstico, quer no que diz respeito ao tratamento e prevenção da alergia ao veneno de himenópteros.

Relativamente ao diagnóstico, graças às tecnologias de biologia molecular, existem atualmente disponíveis no mercado alérgenos recombinantes de abelhas do mel e de vespas que permitem realizar testes de diagnóstico, com maior sensibilidade e especificidade, em pacientes alérgicos ao veneno de himenópteros, comparativamente com os testes de diagnóstico existentes anteriormente (Müller, 2003).

Relativamente aos tratamentos, estes alérgenos recombinantes também podem ser aplicados (Müller, 2003). Contudo, é de extrema importância, dado que os alérgenos recombinantes são caros, realizar estudos de imunoterapia em cães alérgicos, para observar as suas eficácia, segurança e duração ideais e tentar determinar quais os protocolos mais eficazes. É também importante verificar, em animais, não só a interação que existe entre a ITV e outros medicamentos, como também o uso de anti-histamínicos como pré-medicação em pacientes que tenham reações exuberantes à imunoterapia.

Pode ainda ser uma possibilidade estudar as epidemiologia e incidência atuais, em Portugal, destas reações alérgicas às picadas nos canídeos e verificar se existe alguma relação entre os indivíduos atópicos que desenvolvem sensibilização às picadas de himenópteros.

Continua por se saber qual a incidência de reações anafiláticas às picadas de abelhas ou vespas nos animais de companhia e se os animais se sensibilizam aos mesmos alérgenos do veneno que os pacientes humanos (Müller *et al.*, 2016).

Com tudo isto, podem colocar-se várias questões: Tal como os pacientes humanos, serão os cães igualmente alérgicos à picada de himenópteros? Será que este problema, tão importante e discutido em medicina humana, é em veterinária praticamente inexistente? Estão os donos conscientes do perigo que pode representar este problema e sabem como o podem prevenir?

Torna-se por isso importante incidir o trabalho em diversos aspetos, de modo a que se obtenha o máximo de informação e dados possíveis sobre este tema.

Parte III

Alergia à picada de Himenópteros

1. Fase I - Alergia dos cães à picada por himenópteros em Portugal

1.1. Objetivo da fase I

A primeira fase deste trabalho teve como objetivo entender a realidade de Portugal continental no que diz respeito à alergia a himenópteros. Através da realização de um inquérito a vários médicos veterinários de múltiplas clínicas e hospitais, procurámos identificar o número de casos por região, a estação do ano em que ocorrem mais casos, quais os cães mais suscetíveis relativamente ao seu estilo de vida, idade ou raça, quais as regiões do corpo mais afetadas e sintomas mais frequentes, quais os tratamentos e prevenção propostos pelos veterinários e perceber se o número de casos está ou não relacionado com a existência de apicultura e consequentemente, de maior número de abelhas de mel na região.

1.2. Materiais e Métodos

1.2.1. Inquéritos às clínicas

Foram selecionadas 90 clínicas veterinárias distribuídas por várias regiões de Portugal continental com o intuito de estimar a frequência de casos de alergia à picada em cães e se os casos estão relacionados e ocorrem, maioritariamente, em regiões de produção de mel, onde prolifera uma grande quantidade de abelhas do tipo *Apis mellífera*. Para tal, foram realizadas chamadas telefónicas às clínicas selecionadas e feito um inquérito rápido às mesmas, tendo sido os dados registados no computador. O inquérito realizado para este fim encontra-se disponível no anexo I. Neste estudo foi ainda perguntado se existam apicultores com cães a recorrer a serviços médico-veterinários devido às reações alérgicas provocadas pelas abelhas. Perguntou-se ainda quais as épocas mais frequentes das picadas, a idade em que ocorre a maioria dos casos, quais as regiões do corpo mais afetadas, quais os sintomas mais frequentes, quais os tratamentos mais utilizados para este tipo de situações e se os médicos veterinários dão ou não sugestões para prevenir este problema. O inquérito foi construído nos formulários do *Google Forms*, disponíveis em <https://www.google.com/forms>, e automaticamente

registado numa folha de *Excel* respetiva. Foram selecionadas clínicas veterinárias de diferentes regiões do país, não tendo a amostra sido aleatória, mas sim selecionada de uma forma intencional, com o intuito de obter informações representativas das diferentes regiões continentais (Alentejo, Algarve, Lisboa e Vale do Tejo, Centro e Norte).

Em relação ao desenho deste questionário foram tidas em consideração as metodologias aconselhadas por Fowler (1995). O questionário foi constituído essencialmente por perguntas de resposta fechada e por questões de fácil compreensão apresentadas por uma ordem lógica. Também houve cuidado para que o questionário não fosse longo demais. Antes de iniciar os questionários realizou-se um pré-teste para um grupo de 7 pessoas não relacionadas com o estudo e sem formação médico-veterinária, para evitar erros de formulação e para destacar equívocos ou incompreensões nas respostas.

1.2.2. Análise de resultados e estatística

Para realizar a análise dos dados, foi usado o programa *RCommander* disponível como *plugin* no *R* para *MacOS* (2014). Todos os gráficos foram construídos no *Microsoft Excel: Mac* 2011. Para fazer um mapa com as coordenadas geográficas de todas as clínicas envolvidas no estudo (figura 8), foi usado o *Google Earth* 7.1.5 e o *QGIZ* 2.10. Igualmente para a distribuição do número de casos para cada clínica, foi criado outro mapa (figura 22) usando o mesmo programa e os dados de *Excel* obtidos através dos inquéritos telefónicos.

Para correlacionar o número de colónias de insetos com o número de casos e ver se existe alguma relação a valorizar, foi usada informação relativamente à distribuição do número total de apiários, colmeias, cortiços e colónias por distrito/concelho/freguesias, disponível no Anexo II e gentilmente disponibilizada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). A partir dos dados da DGAV foi criado um mapa no *QGIZ* (figura 23), com base na Carta Administrativa de Portugal (CAOP), onde foram associados o número de colónias com as respetivas áreas (neste caso específico concelhos) e calculada a densidade por concelho (número de colónias/km²).

Para permitir a análise estatística, o número de casos foi dividido em 4 categorias: 1 a 9 casos/ano, 10 a 19 casos/ano, 20 a 30 casos/ano e >30 casos/ano.

Para relacionar e analisar o número de casos de cada clínica com a densidade das colónias por concelho, e dado o parâmetro densidade não ter uma distribuição normal, foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis disponível no *RCommander*.

A hipótese nula foi definida como a inexistência da relação entre número de casos clínicos por picadas de himenópteros e a densidade de abelhas por concelho. O resultado era considerado significativo se $p < 0,05$.

1.3. Resultados

1.3.1. Inquéritos às clínicas veterinárias

Das 90 clínicas seleccionadas, 44 responderam ao inquérito realizado por telefone, correspondendo a uma taxa de sucesso de 48,9%. Das restantes 46 clínicas, 6 pediram para que o inquérito fosse enviado por *e-mail*, mas não o devolveram posteriormente.

Das 44 clínicas que responderam, 8 eram da região do Alentejo, 7 da região do Algarve, 4 da região de Lisboa e Vale do Tejo (LVT), 14 da região Centro e 11 da região do Norte. As clínicas contactadas estão representadas na figura 8.



FIGURA 8. DISTRIBUIÇÃO DAS CLÍNICAS CONTACTADAS EM PORTUGAL CONTINENTAL.

Relativamente à questão “Em que estação do ano ocorrem a maioria dos casos?” (figura 9), a resposta mais seleccionada foi primavera (68,2%), seguida de verão (29,5%). Apenas uma das clínicas respondeu outono (2,3%) e ninguém seleccionou inverno.

FIGURA 9. GRÁFICO DA ESTAÇÃO DO ANO MAIS FREQUENTE

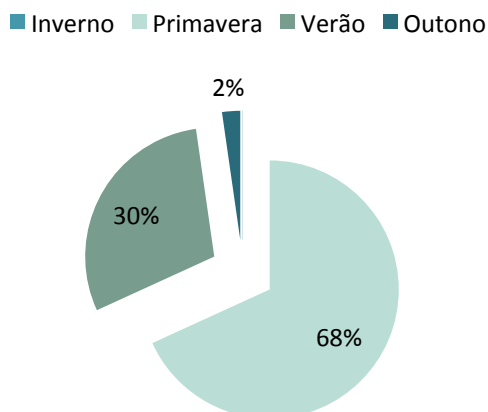
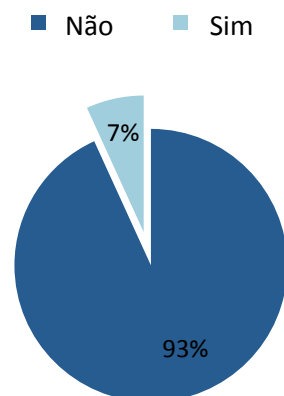


FIGURA 10. GRÁFICO SOBRE AGENTE ENVOLVIDO



Quando questionados sobre o agente envolvido (figura 10), 93,2% dos inquiridos afirmaram que o dono não sabia ao certo qual o agente envolvido e apenas 6,8% disseram que o dono normalmente sabia. Destes, 66,7% disseram que tinham sido as abelhas e 33,3% disseram que as vespas eram as mais frequentes.

No que respeita à questão “Qual a idade em que ocorrem mais frequentemente estes casos?” (figura 11), 63,6% das clínicas afirmaram ser em adultos jovens (6 meses a 2 anos), 11,4% em cachorros (até 6 meses), 13,6% em adultos (2 anos a 8 anos), em nenhum caso sendo citados casos geriátricos (mais de 8 anos). 11,4% dos inquiridos referiram que não existe uma idade mais frequente e que estas reações podem surgir em diferentes idades.

FIGURA 11. GRÁFICO SOBRE IDADE MAIS FREQUENTE

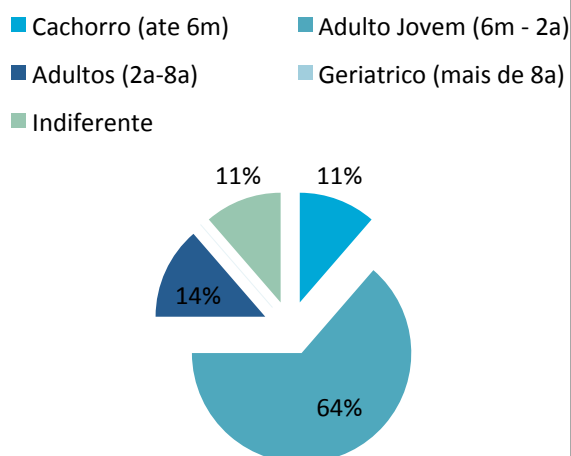
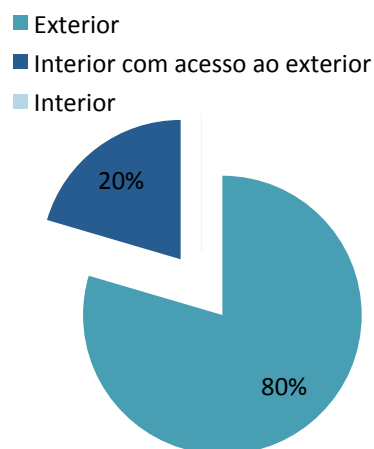
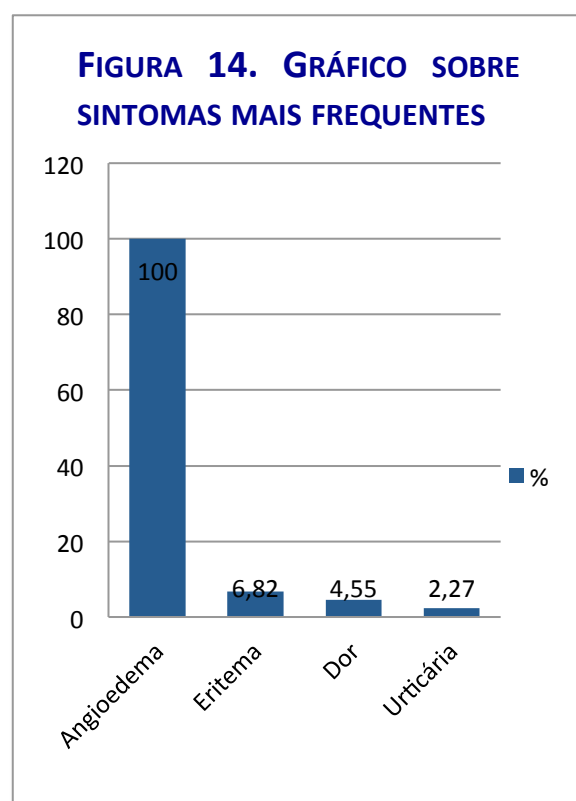
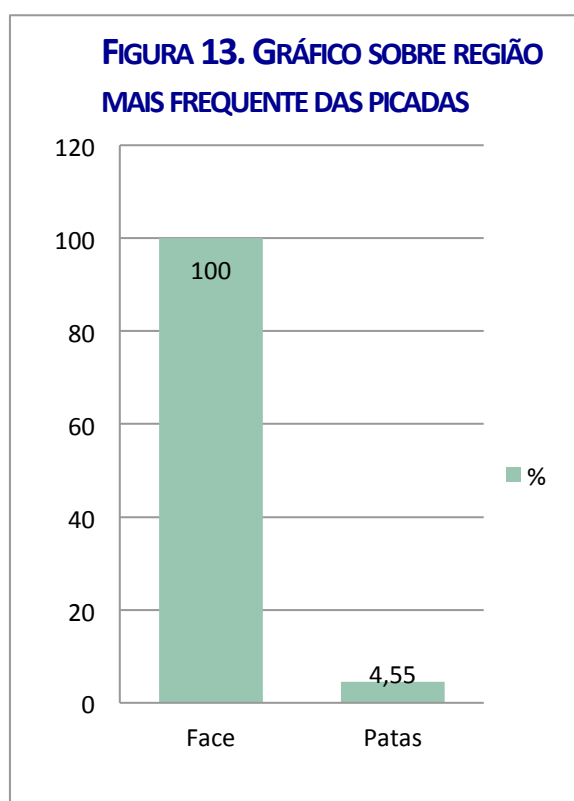


FIGURA 12. GRÁFICO SOBRE ESTILO DE VIDA MAIS FREQUENTE



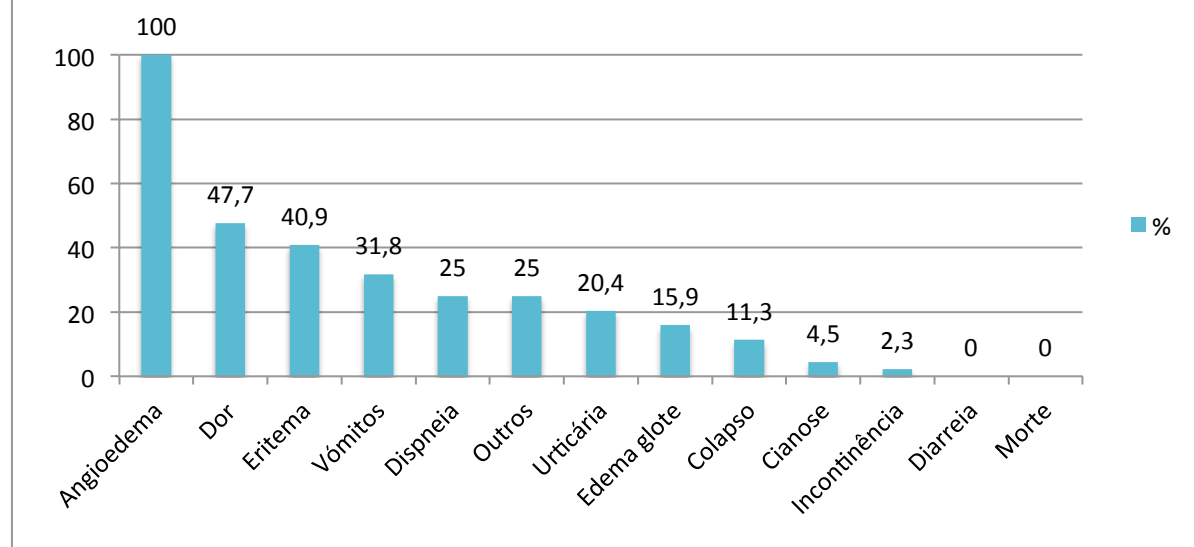
Relativamente à pergunta “Qual o estilo de vida do cão na maioria dos casos?” (figura 12), 79,6% dos inquiridos afirmaram tratar-se de cães de exterior e 20,4% de cães de interior quando estão no exterior.

No que concerne à pergunta “Qual a região mais frequente da picada?” (figura 13), todos os inquiridos (100%) afirmaram que a região da face é a zona mais afetada, tendo ainda 2 dos inquiridos (4,5%) adicionado a região das patas.



Na questão “Quais são os sintomas mais frequentes nestes casos?” (figura 14), todos os inquiridos (100%) selecionaram angioedema, 6,8% referiram ainda eritema, 4,5% juntaram dor e 1 dos inquiridos (2,3%) falou em urticária. Em resposta a “Quais os sintomas que já teve na clínica devido à picada de himenópteros?” (figura 15), 100% afirmaram ter observado angioedema, 47,7% dor, 40,9% eritema, 31,8% vômitos, 25% dispneia, 20,4% urticária, 11,3% colapso, 4,5% cianose e 2,3% incontinência. 25% referiram outros sinais como febre, hipotensão, inapetência, prostração, abscessos e, finalmente, 15,9% dos inquiridos afirmaram ter observado casos de edema da glote. De referir ainda que nenhum dos inquiridos teve qualquer óbito devido a esta situação.

FIGURA 15. GRÁFICO DOS SINTOMAS QUE JÁ SURTIRAM NOS CASOS DE ALERGIA POR PICADA DE HIMENÓPTEROS



Relativamente à questão “Quais os tratamentos mais utilizados?” (figura 16), 97,7% das clínicas inquiridas afirmaram usar corticoesteróides, 43,2% antihistamínicos, 11,4% frio, 6,8% epinefrina, 2,3% fluídoterapia e em nenhum caso foi efetuada oxigenioterapia ou proposta imunoterapia. De todos os inquiridos, 6,8% referiram o uso de antibióticos orais e 9,1% outros tratamentos como massagens, anti-inflamatórios não esteróides (AINES), tranquilizantes e protetores gástricos. No que respeita à pergunta “Adequa o tratamento à gravidade do problema?”, 65,9% responderam que sim e 34,1% que não.

FIGURA 16. GRÁFICO SOBRE TRATAMENTOS MAIS UTILIZADOS

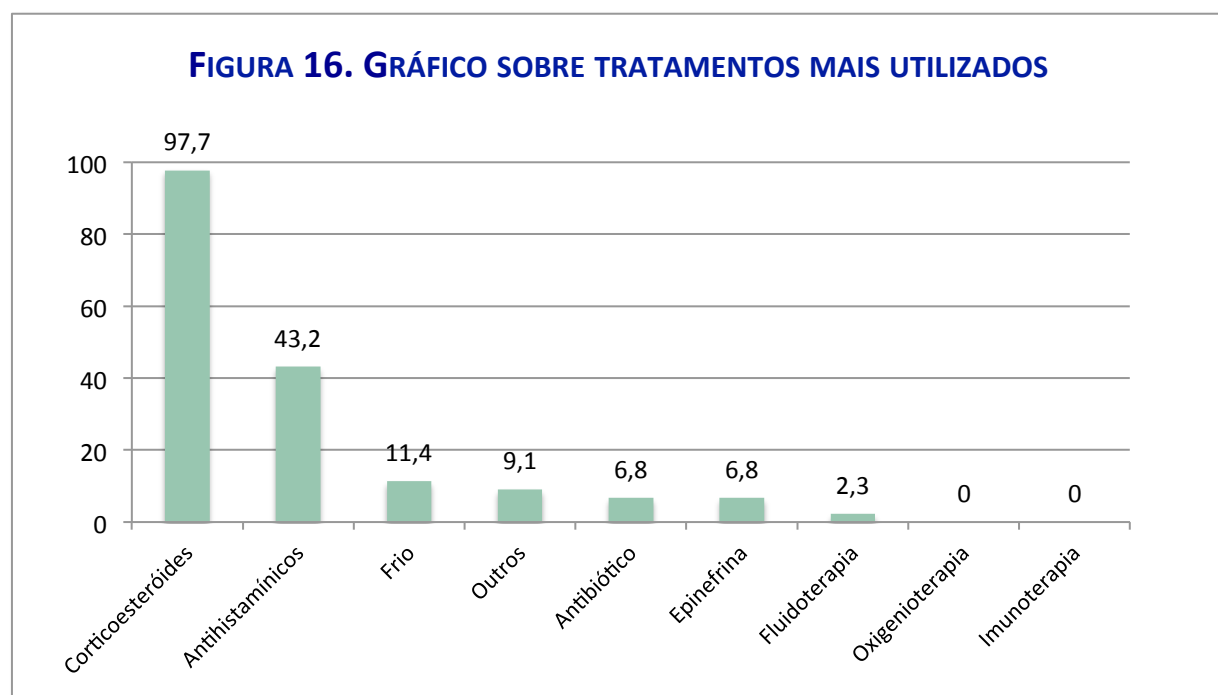


FIGURA 17. GRÁFICO SOBRE CONSELHOS PARA PREVENÇÃO

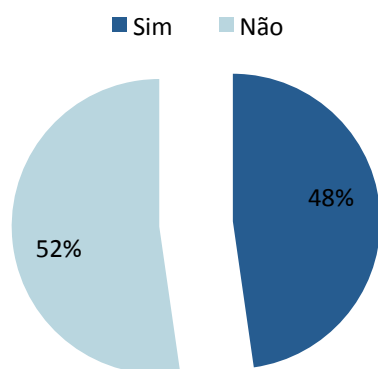
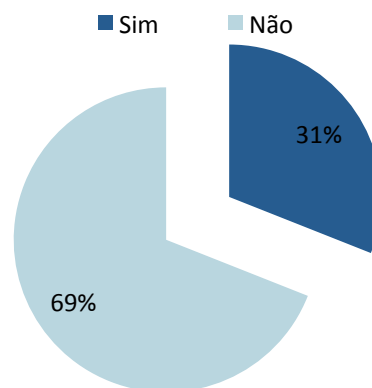


FIGURA 18. GRÁFICO SOBRE PREDISPOSIÇÃO DE RAÇAS



Quanto à pergunta "São dados alguns conselhos para prevenir este problema?" (figura 17), apenas cerca de metade 47,73% dos inquiridos afirmaram que sim.

Relativamente à questão "Considera que existe uma raça mais predisposta?" (figura 18), 69% afirmaram que não e 31% afirmaram que sim. Das respostas afirmativas, 53% sugerem que os animais são mais predispostos pela sua curiosidade e não tanto pela raça em si, embora o Labrador Retriever, o Boxer e algumas raças de cães pastores tenham sido indicadas como raças em que acontecem mais casos. 18% das respostas afirmativas apontam uma predisposição da raça Boxer para este problema, 12% apontam predisposição nas raças de pelo curto, 6% nos Cocker Spaniel, 6% nas raças braquicéfalas e 6% apontam ainda as raças puras em geral como as mais predispostas.

FIGURA 19. GRÁFICO SOBRE APICULTORES COM CÃES E ALERGIA AOS HIMENÓPTEROS

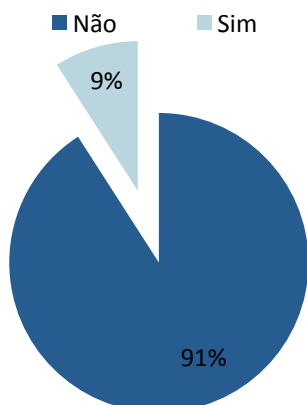
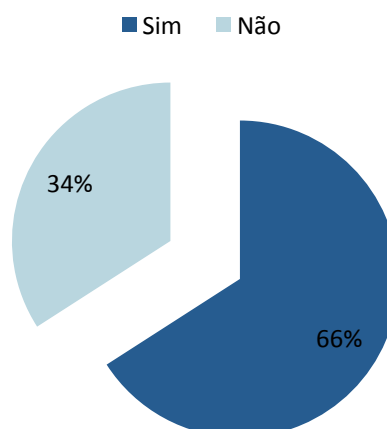


FIGURA 20. GRÁFICO SOBRE APICULTORES NA REGIÃO



Na questão “Alguma vez teve algum caso de um apicultor com um cão a procurar o veterinário por este problema?” (figura 19), 90,9% dos inquiridos afirmaram que não e apenas 9,1% que sim. Na questão “Sabe se existem apicultores na região?” (figura 20), 65,9% dos inquiridos confirmaram a sua existência.

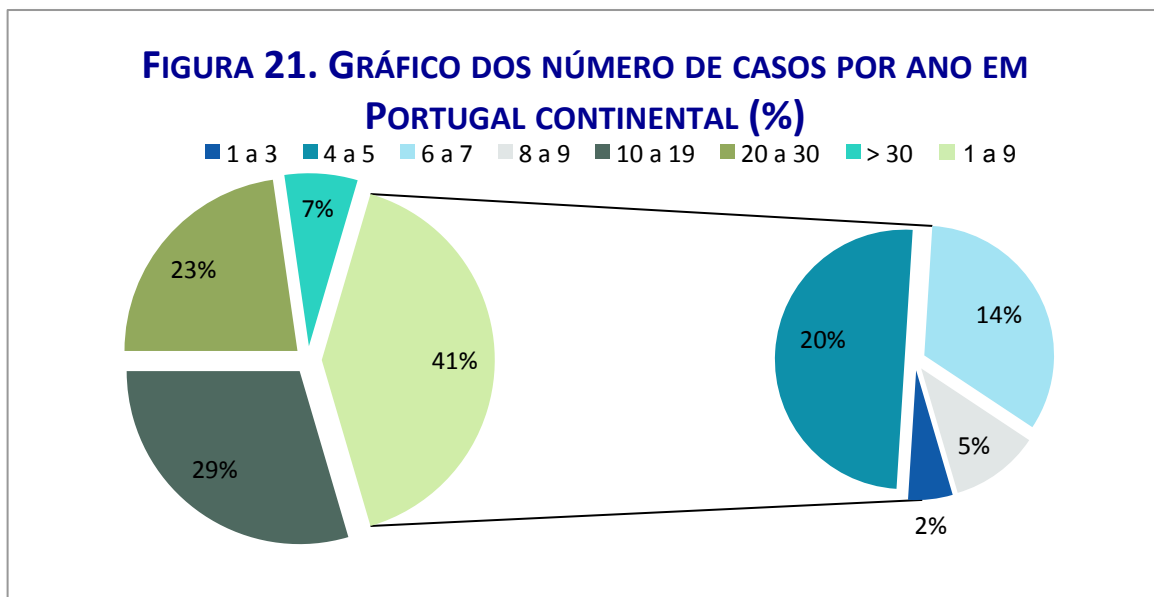


FIGURA 22. DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE CASOS POR ANO EM PORTUGAL CONTINENTAL.

Relativamente ao número de casos por ano (figura 21), 2,3% dos inquiridos afirmaram ter em média 1 a 3 casos por ano, 20,5% uma média de 4 a 5 casos por ano, 13,6% uma média de 6 a 7 casos por ano e 4,6% uma média de 8 a 9 casos por ano. Se juntarmos as percentagens, 40,9% das clínicas

inquiridas têm 1 a 9 casos por ano. Na média de 10 a 19 casos por ano, a taxa de resposta foi de 29,5%, na média de 20 a 30 casos por ano, foi de 22,7% e 6,8% das clínicas inquiridas afirmaram ter mais de 30 casos/ano. A distribuição dos casos/ano encontra-se representada no figura 22.

Quando estudados por região, dos 11 inquiridos na região Norte, podemos verificar que 45,5% têm 1 a 9 casos por ano, divididos por 18,2% com 4 a 5 casos/ano e 27,3% com 6 a 7 casos/ano. 36,4% têm 10 a 19 casos/ano, 9,1% têm 20 a 30 casos/ano e 9,1% têm mais de 30 casos/ano.

Na região Centro, dos 14 inquiridos, 21,4% têm 1 a 9 casos/ano, divididos por 7,1% com 4 a 5 casos/ano, 7,1% com 6 a 7 casos/ano e 7,1% com 8 a 9 casos/ano. 28,6% têm 10 a 19 casos/ano, 35,7% têm 20 a 30 casos/ano e 14,3% têm mais de 30 casos/ano.

No Alentejo, dos 8 inquiridos, 75% têm 1 a 9 casos, divididos por 12,5% com 1 a 3 casos/ano, 37,5% com 4 a 5 casos/ano, 12,5% com 6 a 7 casos/ano e 12,5% com 8 a 9 casos/ano. 12,5% têm 10 a 19 casos/ano e 12,5% têm 20 a 30 casos/ano, não existindo ninguém com mais de 30 casos/ano.

No Algarve, dos 7 inquiridos, 28,57% têm 1 a 9 casos/ano, divididos em 14,3% com 4 a 5 casos/ano e 14,3% com 5 a 6 casos/ano. 42,9% têm 10 a 19 casos/ano, 28,6% têm 20 a 30 e ninguém tem mais de 30 casos/ano.

Relativamente a Lisboa e Vale do Tejo, dos 4 inquiridos, 50% têm 4 a 5 casos por ano, 25% têm 10 a 19 casos/ano e 25% têm 20 a 30 casos por ano.

Para além de todas estas questões, foi ainda perguntado se os clínicos “consideravam a alergia às picadas de himenópteros um tema importante em veterinária”, sendo que 65,9% dos inquiridos afirmaram que sim.

1.3.2. Densidade de abelhas por concelho

Como referido anteriormente, a densidade por concelho foi calculada usando o número de colónias por concelho (dados cedidos pela DGAV) e as áreas (km²) de cada concelho (CAOP).

A partir destes dados (figura 23) é possível verificar que existem duas regiões onde a densidade de abelhas é maior: numa parte da região Norte e na região do Algarve (4.06-25.57). Na região de LVT, a densidade é variável entre concelhos, com densidades baixas na maior parte da região, exceção feita aos concelhos de Sobral de Monte Agraço, Almada, Seixal e Setúbal. No que diz respeito à região Centro, existe grande variabilidade de densidades consoante os distritos, mas a densidade tende a ser maior no interior centro. Apesar de ser a região que tem maior número de apicultores, a maioria destes são de pequena dimensão (MAPDR, 2010). A região do Alentejo também tem grande variabilidade, sendo que a maior densidade se situa mais no litoral sul.

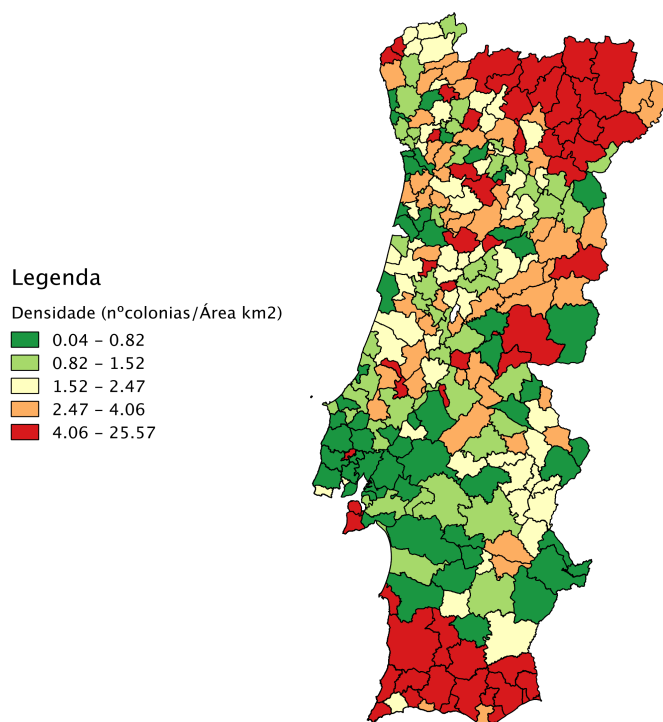


FIGURA 23. MAPA DA DENSIDADE (Nº DE COLÓNIAS/KM²) DOS CONCELHOS.

1.3.3. Relação entre número de casos e a densidade de abelhas por concelho

O parâmetro densidade não tinha distribuição normal já que o *p-value* era $< 0,05$ pelo teste Shapiro-Wilk (Tabela 6) (Callegari-Jacques, 2003), e como tal, não foi possível usar a clássica análise de variância (ANOVA), sendo por isso escolhido o teste de Kruskal-Wallis.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 7) no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, podemos concluir que o *p-value* (0,4801) é maior que 0,05 e, como tal, a hipótese nula não é descartável, ou seja, não existe relação entre o número de casos de alergia à picada de himenópteros por ano e a densidade de abelhas por concelho.

TABELA 6. TESTES DE NORMALIDADE DA VARIÁVEL DENSIDADE.

Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)			
	Statistic	Df	Sig.
Densidade	.688	44	.000

TABELA 7. TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL-WALLIS.

Teste Kruskal-Wallis	
Total N	44
Teste estatístico	2.473
Graus de liberdade	3
Nível de significância (<i>p-value</i>)	0.4801

1.4. Discussão

1.4.1. Inquéritos às clínicas veterinárias

Estes inquéritos foram realizados com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre a realidade desta doença no país. A taxa de resposta aos inquéritos foi de 48,9%. Esta taxa de sucesso não foi a expectável e ocorreu porque a maioria dos veterinários das clínicas estavam ocupados na altura do telefonema. O inquérito foi repetido noutra altura, até um máximo de duas chamadas. Para melhorar a investigação atual, deverão ser realizados mais contactos com o intuito de aumentar o número de participantes e assim obter mais dados e tornar o estudo mais fidedigno, principalmente na região de LVT, onde a taxa de sucesso de resposta foi muito baixa (4 respostas em 15 contactados).

Considerando todas as limitações da interpretação dos resultados motivadas pela taxa conseguida de resposta dos inquéritos telefónicos, foi possível tirar algumas ilações relativas às questões colocadas.

Nos dados recolhidos através dos inquéritos fomos capazes de identificar que o local de eleição das picadas em cães é a face, principalmente na região do focinho, existindo também alguns casos de picadas nas patas. Este facto é facilmente explicável se tivermos em conta que os cães, principalmente os mais curiosos, utilizam o focinho para farejar lugares ou coisas, estando assim mais predispostos à picada (Steen, Mohus, Kvesetberg & Walløe, 1996). Pela mesma razão, os cães utilizam também as patas para escavar ou tocar em coisas, o que, neste caso, pode levar à picada por himenópteros.

Relacionado ainda com este comportamento de curiosidade está a pergunta “Existe alguma raça predisposta?”. Nesta verificámos que, das respostas afirmativas (31%), mais de metade dos inquiridos (53%) atribuem a predisposição à curiosidade dos animais e não tanto a uma relação direta com raças, embora raças mais curiosas tendam a ser eventualmente mais predispostas à picada. Outro fator que pode ainda influenciar o facto de estas raças surgirem mais comumente com este tipo de alergia poderá ser o fator popularidade da raça, sendo que quanto mais popular for a raça, maior número de indivíduos existem no território nacional, logo maior será também a probabilidade destes serem picados por himenópteros e, consequentemente, manifestarem reações alérgicas. Ainda assim, na bibliografia estão descritas algumas raças (Bull Terrier, Staffordshire Terrier, Boxer e Pit Bull Terrier Americano) que têm maior incidência para reações graves à picada de insetos (Cowell & Cowell, 1995 citado por Fitzgerald & Flood, 2006; Miller *et al.*, 2013) e, neste trabalho, 18% dos clínicos inquiridos realmente afirmam que acreditam existir alguma predisposição dos

Boxer para este tipo de alergia. Tendo ainda em consideração que existe predisposição de algumas raças para dermatite atópica (Jaeger *et al.*, 2010), seria interessante verificar se existe alguma relação desta com a alergia à picada dos himenópteros, tornando assim algumas raças mais predispostas também a alergia por picadas, ou se, pelo contrário, assim como em medicina humana, a alergia à picada de himenópteros não é mais comum em indivíduos atópicos (Novembre *et al.*, 1998 citado por Krishna *et al.*, 2011). Mais estudos poderão dar novas indicações sobre este tema.

Ainda relativo ao comportamento curioso dos canídeos, vem a pergunta sobre qual a idade mais frequente dos casos. Apesar de alguns clínicos identificarem outras idades e 11,4% afirmarem que os casos podem surgir em qualquer idade e não existe uma maior frequência dependendo da idade, a maioria (63,6%) diz existir uma maior incidência nos jovens adultos (6 meses a 2 anos), incidência esta amplamente justificada pelo facto de ser esta a idade da curiosidade e da exploração dos cães (Starling, Branson, Thomson & McGreevy, 2013), o que os predispõe mais às picadas.

No que diz respeito à estação do ano mais frequente, concluiu-se que a generalidade dos casos ocorre nas estações da primavera e verão, existindo uma incidência inferior no outono. Esta questão vai ao encontro do publicado, quer em medicina veterinária (Fitzgerald & Flood, 2006), quer em medicina humana relativamente à zona mediterrânica (Navarro *et al.*, 2004, Mingomataj, 2003).

Quanto ao agente envolvido, a maioria dos clínicos explica que os donos, na generalidade dos casos (93,2%), não têm ideia de qual o agente responsável, o que está de acordo com o expectável, já que grande parte dos casos ocorre sem ser na sua presença (Fitzgerald & Flood, 2006).

Relativamente ao estilo, cães de exterior estão mais suscetíveis à picada de himenópteros, na medida em que estes vivem no exterior, por isso seria expectável que a maioria dos casos ocorressem em cães de exterior ou em cães com acesso ao exterior, facto confirmado pelos resultados.

Quanto aos sintomas apresentados, o angioedema foi identificado por todos os inquiridos deste estudo como o mais importante, tendo ainda alguns adicionado o eritema, a dor e as reações urticariformes. Estes resultados foram ao encontro do descrito na bibliografia (Miller *et al.*, 2013). Também por conversa com os clínicos, entendeu-se que reações graves de angioedema na cabeça dos animais são maioritariamente atribuídas aos himenópteros e casos mais graves de anafilaxia, em que o angioedema não está presente, a alergia à picada de himenópteros é excluída dos diagnósticos diferenciais. Contudo, alguns dos clínicos inquiridos (31,8%) afirmam que os animais com suspeita de reação alérgica à picada de

himenópteros apresentam vômitos associados, o que, de acordo com a tabela 4 adaptada de Fitzgerald e Flood (2006), está descrito como sendo uma reação grave de anafilaxia. Outros sinais graves descritos incluem a dispneia, colapso, cianose e incontinência. De referir também que 15,9% dos inquiridos diz já terem surgido no consultório cães com edema da glote como consequência da alergia grave à picada de abelha. Nenhum dos clínicos afirma ter observado uma situação de coma ou caso mortal, explicável pelo facto de os casos de morte por anafilaxia serem raros e serem geralmente pré-hospitalares, podendo dever-se ainda a outras causas, como reações adversas a medicamentos e vacinas ou mordeduras venenosas (Dhupa, 2005; Shmuel & Cortes, 2013; Schaer *et al.*, 2015), sendo por isso difíceis de identificar. Todos estes sinais clínicos mais graves estão descritos na bibliografia (Fitzgerald & Flood, 2006; Miller *et al.*, 2013; Boord, 2014). Seria interessante, mais uma vez, fazer um estudo sobre a prevalência dos sinais clínicos em animais alérgicos à picada de himenópteros, confirmando que, de facto, estes sinais e outros que possam surgir se devem mesmo a himenópteros ou a algum dos outros diagnósticos diferenciais, principalmente reações adversas, alergia à processionária ou lagarta do pinheiro e outras reações alérgicas.

Relativamente aos tratamentos usados, a maioria dos clínicos (66%) ajusta os tratamentos conforme a gravidade do problema. Os corticóides sistémicos são os fármacos mais utilizados (97,7%), sendo que muitos clínicos ajustam o número de dias de tratamento à gravidade da situação. Se for pouco grave, normalmente usam uma administração e, se não ceder à terapia, ajustam para mais 2 a 3 dias. Alguns adicionam ainda anti-histamínicos, frio ou fluidoterapia ao tratamento. Foram poucos os casos em que algum clínico teve de usar epinefrina para tratamento deste problema.

Pelo que está descrito na bibliografia, a maioria dos casos resolve-se em 24 horas e os casos pouco complicados podem ser rapidamente resolvidos com anti-histamínicos, frio, lidocaína tópica ou loções tópicas com corticosteróides (Fitzgerald & Flood, 2006; Miller *et al.*, 2013). A administração de glucocorticóides sistémicos deverá ser utilizada apenas em casos de reações regionais exuberantes ou em casos de múltiplas picadas (Fitzgerald & Flood, 2006). Se existir hipotensão, deve fazer-se fluidoterapia e, em casos de anafilaxia grave, pode ser necessário o uso de epinefrina parentérica (Fitzgerald & Flood, 2006) e ponderar a administração de oxigénio. Pelos resultados observados, concluímos que parece existir alguma relutância em utilizar a epinefrina nos cães para casos graves de anafilaxia, como por exemplo angioedemas graves, mesmo que este fármaco, administrado por via intramuscular, seja considerado pela Organização Mundial de Saúde, um fármaco de eleição para casos de anafilaxia em pacientes humanos (Dhupa, 2005; Golden, 2007; Shmuel & Cortes, 2013).

A maioria das picadas não se torna infetada e, por isso, não existe a necessidade do uso de antibiótico para este tipo de problemas (Cowell & Cowell, 1995 citado por Fitzgerald & Flood, 2006). Dado o atual cuidado com as resistências aos antibióticos, o seu uso não deve ser equacionado como fármaco de rotina para estas situações, salvo algumas exceções pontuais, devendo-se, mesmo assim, evitar a sua administração oral e optar eventualmente por formulações tópicas. Além de todos os fármacos que podemos usar, deveremos sempre pensar na possibilidade de fazer imunoterapia específica posteriormente, principalmente em cães com fatores de risco elevados e em relação aos quais é impossível evitar o contacto entre canídeos e himenópteros. Deverá ser feita uma investigação mais profunda na área da medicina veterinária sobre este assunto, na medida em que apenas existem protocolos experimentais e poucos de dados, até à data, sobre a eficácia da imunoterapia a veneno de himenópteros nos cães. O melhor tratamento é, sem qualquer dúvida, a prevenção e, para além da imunoterapia, podem ainda ser dados diversos conselhos aos donos no sentido de evitar as picadas. Neste inquérito foi possível averiguar que, em 52,3% dos casos, não são dados quaisquer tipos de conselhos específicos para este problema e que, quando dados (47,7%), a maioria são conselhos generalistas e pouco praticáveis, como é o exemplo de tentar evitar que o cão brinque com himenópteros. Contudo, alguns clínicos referiram o uso de repelentes de insetos e pelo menos um referiu o cuidado com os alimentos deixados ao ar livre (comedouros, frutas) que são atrativos de himenópteros. Existem cuidados que não foram referidos e que poderão ser importantes, como champôs de cheiro intenso, cuidado com fontes de água, com lixos, paredes de cores escuras, comprimento do pelo entre outras (Fitzgerald & Flood, 2006; Fitzgerald, 2013; Krishna *et al.*, 2011; Cowell & Cowell, 1995).

No que diz respeito às perguntas sobre os apicultores, os resultados não foram os expectáveis. A maioria dos clínicos sabia da existência de apicultores na região, contudo, os casos de apicultores com cães picados que recorreram ao veterinário são muito baixos, pois apenas quatro clínicos dizem ter tido uma consulta com cães de apicultores picados pelas abelhas. Estes resultados poderão ter várias explicações possíveis. Primeiro, o veterinário pode não conhecer a profissão ou as atividades lúdicas do proprietário, logo pode não saber se o cão é ou não de um proprietário com colmeias de abelhas. Segundo, um dos clínicos inquiridos, também ele apicultor, referiu ainda que os apicultores normalmente não têm cães porque conhecem os riscos associados e consideram as abelhas o seu “animal de companhia”. Por último, outra possibilidade é a de que a maioria dos apicultores não leva o cão ao veterinário. Mais estudos deveriam ser realizados para se entender se, de facto, não há apicultores com cães, se não vão ao veterinário ou se, eventualmente, os cães dos apicultores podem ser menos

predispostos às picadas das abelhas por realizarem uma “dessensibilização natural”. Seria também interessante fazer um estudo semelhante para averiguar qual a prevalência de casos de cães de caçadores picados por himenópteros, na medida em que pelo menos quatro clínicos em regiões mais rurais referiram ter alguns casos destes e serem bastante mais frequentes do que os de apicultores.

Em relação ao número de casos clínicos no território de Portugal continental, apesar de se poderem retirar algumas conclusões, não existem dados que possibilitem análises estatísticas de grande significância e estudos de prevalência dos casos, na medida em que não foi possível saber com precisão a totalidade de casos clínicos que surgem em cada consultório por ano. E mesmo as clínicas que têm alguma estimativa, tendem a não ter dados exatos.

Relativamente à região Norte do país, existe grande variação no número de casos. Seria expectável, dado ser a região com maior número de colónias (102754 colónias de abelhas de mel segundo os dados da DGAV (comunicação pessoal, outubro, 2015)), que existisse um grande número de casos comparativamente a outras regiões do país. Quase metade das clínicas contactadas (45,5%) tem em média 4 a 7 casos/ano, existindo ainda algumas clínicas com 10 a 19 casos/ano (36,4%) e ainda outras com mais de 20 casos/ano (18,2%). Os resultados indicam que existem alguns casos nesta região e que mais de metade das clínicas (54,5%) tem mais de 10 casos/ano.

No que diz respeito à região Centro, os resultados foram inesperados, na medida em que metade das clínicas estudadas (50%) tem mais de 20 casos por ano. Seria expectável, pelos dados da DGAV (comunicação pessoal, outubro, 2015) (48430 colónias de abelhas de mel), que o número de casos fosse inferior aos apresentados na região Norte, facto que não se verificou.

Na região do Alentejo, era expectável que o número de casos fosse reduzido, na medida em que o número de colónias de abelhas de mel é mais baixo (46619 colónias) (DGAV, comunicação pessoal, outubro, 2015) e, além disto, a densidade populacional humana nesta região é a mais baixa de Portugal continental (Pordata, 2011), o que reduz consequentemente a densidade da população canina. Nesta região, 75% das clínicas inquiridas responderam que tinham 1 a 9 casos por ano, o que confirmou, de certa maneira, a baixa presença de casos nesta região, comparativamente a outras.

Na região do Algarve, os resultados foram os esperados porque, sendo a segunda região com mais colónias (71239 colónias de abelhas de mel) (DGAV, comunicação pessoal, outubro, 2015), seria expectável uma grande percentagem de casos por ano, ainda que menor do que na região Norte. O número elevado de casos foi confirmado, uma vez que 71,43% das clínicas

desta região têm mais de 10 casos por ano, mas, ao contrário do esperado, constitui um número maior do que o relativo à região Norte.

Relativamente à região LVT, não podem ser tiradas ilações relativamente ao número de casos porque o número de clínicas que responderam ao inquérito foi muito reduzido e revelou resultados variáveis e inconclusivos que não tornaram possível a sua análise crítica. De acordo com os dados da DGAV, esta região têm o número de colónias de abelhas de mel mais baixo de Portugal continental (17806 colónias) (DGAV, comunicação pessoal, Outubro, 2015), o que torna expectável que tivesse um número de casos mais reduzido do que as outras regiões.

De referir ainda que o número de casos também pode ser influenciado por outros factores distintos que serão abordados na continuação deste trabalho.

Por tudo isto, seria interessante realizar um estudo epidemiológico para estimar o número de casos de alergia à picada de himenópteros pelo número total de casos por ano, para se ter bases mais exatas e conseguir, assim, fazer um estudo correto da incidência dos animais alérgicos picados por himenópteros. Apesar de tudo, a partir do presente trabalho, foi possível ter uma ideia mais geral sobre os casos de picadas por himenópteros em Portugal.

Não foram encontrados, até à data, dados relativos a prevalências em medicina veterinária sobre as picadas de himenópteros em cães.

No que diz respeito à importância do tema sobre a alergia à picada de himenópteros em veterinária era expectável que a maioria considerasse um tema relevante, na medida em que as picadas por insetos são situações de risco e muitas vezes de urgência médica que podem levar à morte dos animais (Shmuel & Cortes, 2013; Mughal *et al.*, 2014). Tal facto foi confirmado por 65,9% dos inquiridos, contudo, na ótica dos autores do presente trabalho, esta percentagem é baixa dada a importância do tema. Poderá ter influência o facto de estarem descritos poucos casos de grande gravidade (Waddell & Drobatz, 1999), a percentagem de mortes por ano por picadas de insetos ser também desconhecida e a maioria dos casos que surge no veterinário é de resolução relativamente rápida.

1.4.2. Relação entre número de casos e a densidade de abelhas por concelho

Os dados encontrados confirmaram a inexistência de relação entre número casos clínicos por picadas de himenópteros e a densidade de abelhas por concelho, e podem ter várias análises possíveis. Como já foi referido anteriormente, o estudo carece de mais amostras para que seja possível tirar conclusões com maior exatidão. Contudo, são possíveis algumas explicações para estes resultados.

Em primeiro lugar, os dados relativos à densidade de abelhas por concelho em Portugal poderão não ser os mais corretos, isto porque há sempre um número de apicultores que não registam as suas produções nem o número de abelhas que possuem. Razões possíveis para isso podem ser não só o facto de se tratar de produtores de muito pequena dimensão, como o facto de se tratar de atividade meramente lúdica, mesmo que, segundo um estudo português, ambas as situações estejam em regressão (Vilas-Boas, 2007). Assim, a densidade de abelhas em alguns concelhos poderá ser mais elevada do que os dados oficiais.

Em segundo lugar, devemos ter em conta a existência de abelhas selvagens (Bushman & Drummond, 2015), para além daquelas que existem nas colmeias de produção, assim como de outros himenópteros (vespas, zangões, *Polistes*), sendo igualmente capazes de picar e causar alergia. Este facto pode influenciar o número de casos e, como tal, deverá ser tido em consideração. A bibliografia considera as vespas mais agressivas, em particular a vespa asiática (Barthélémy, 2008 citado por López, González & Goldarazena, 2011), sendo por isso mais provável que os grandes responsáveis pelos casos de picadas que ocorrem nos cães sejam este tipo de himenópteros. Seria interessante conhecer a prevalência dos casos de alergia a picadas relativamente à família *Vespidae*, apesar da dificuldade gerada pela reação cruzada entre os himenópteros nas técnicas de diagnóstico.

Em terceiro lugar, muitas regiões em Portugal são meios rurais com pouca população e poucos veterinários. Algumas clínicas ficam distantes dos eventuais locais onde ocorrem as picadas e, assim, apesar do caso surgir numa clínica de um concelho onde não há grande densidade de abelhas, a picada pode ter ocorrido numa área de grande densidade. Associado a isto, temos ainda de considerar também o facto de muitas pessoas, particularmente do meio rural, poderem não levar o cão ao veterinário quando este tipo de situações ocorre, na medida em que o acesso ao veterinário é, por vezes, limitado e as clínicas ficam a uma grande distância do local do incidente.

Em último lugar e como também já foi referido anteriormente, é preciso ter em conta que as zonas onde existem menos pessoas serão, em princípio, também zonas de densidade menor de cães e, como tal, um alto número de casos nestas regiões pode não ser equiparável ao de regiões onde a população canina é claramente superior. Sem a informação de quantos pacientes surgem nas clínicas num determinado tempo, ou seja, sem um denominador comum entre as clínicas, a análise torna-se pouco precisa. Seria necessário ter uma prevalência real dos casos de animais alérgicos aos himenópteros para o estudo ser estatisticamente mais preciso.

2. Fase II - Alergia dos cães à picada por himenópteros

2.1. Objetivos da fase II

Usando dados adquiridos na fase um, o objetivo da segunda fase consistiu em tentar identificar se os cães são realmente alérgicos às picadas de himenópteros, associando a anamnese feita aos proprietários dos animais, a partir da realização de um inquérito presencial e usando meios de diagnóstico atuais de medicina humana, determinar se estes são eficazes e seguros para diagnosticar este tipo de alergia.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Seleção dos pacientes

A população usada para este estudo foi composta por pacientes canídeos que se apresentaram à Consulta de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) e do Hospital Veterinário SOSVET de Almada. A amostra foi selecionada por conveniência para que cumprissem os seguintes critérios de inclusão:

- ✓ Terem história suspeita de picadas por himenópteros;
- ✓ Após serem picados, tiveram uma reação local de grandes dimensões, ou uma reação sistémica alérgica ou uma reação sistémica tóxica à picada;
- ✓ Terem sido picados há pelo menos três semanas.
- ✓ Não terem realizado medicação com corticoesteróides e/ou antihistamínicos sistémicos nas últimas três semanas.

Todos os proprietários dos canídeos envolvidos no estudo deram o consentimento informado para a sua participação na investigação (disponível em Anexo III).

Neste estudo foi ainda incluído um grupo de pacientes controlo, com a finalidade de verificar se os testes eram efetivamente negativos em pacientes com os seguintes critérios:

- ✓ Não ter história suspeita de terem sido alguma vez picados por himenópteros;
- ✓ Nunca tiveram reações de anafilaxia grave, ou angioedema ou reações urticariformes;
- ✓ Não terem realizado medicação com corticoesteróides e/ou antihistamínicos sistémicos nas últimas três semanas.

2.2.2. Anamnese dos pacientes

Com o intuito de realizar uma anamnese útil e completa dos pacientes picados por himenópteros, a todos os donos dos cães com reações alérgicas às picadas, e identificar se os donos estão suficientemente informados sobre o que fazer para evitar o problema, foram realizados inquéritos presenciais. Esta anamnese permitiu avaliar em específico a possibilidade de o animal ter sido picado e se a reação se deveu a ou não à picada por himenópteros. No inquérito perguntou-se aos donos quantas vezes o canídeo tinha sido picado ao longo da vida, qual o tipo de reação presente e os sinais clínicos apresentados, se existia certeza sobre o inseto envolvido, se fora de urgência ao veterinário e a que distância ficava, qual o tipo de vida do animal e qual o local onde foi picado. Perguntou-se ainda onde ficava o cão durante o período de férias, qual o grau de preocupação dos donos sobre o assunto, qual a medicação utilizada e se tinham medicamentos de prevenção para utilizar em situações de emergência, se lhes tinham sido dados conselhos para prevenir o problema e qual a idade do paciente aquando da picada. Perguntou-se também se tinham conhecimento de o cão ser alérgico a mais alguma coisa além dos himenópteros, de forma a tentar estabelecer alguma relação entre ambas. O inquérito realizado para este fim encontra-se disponível no anexo IV.

Este inquérito foi construído nos formulários do *Google Forms*, disponíveis em <https://www.google.com/forms>, e automaticamente registado numa folha de *Excel*.

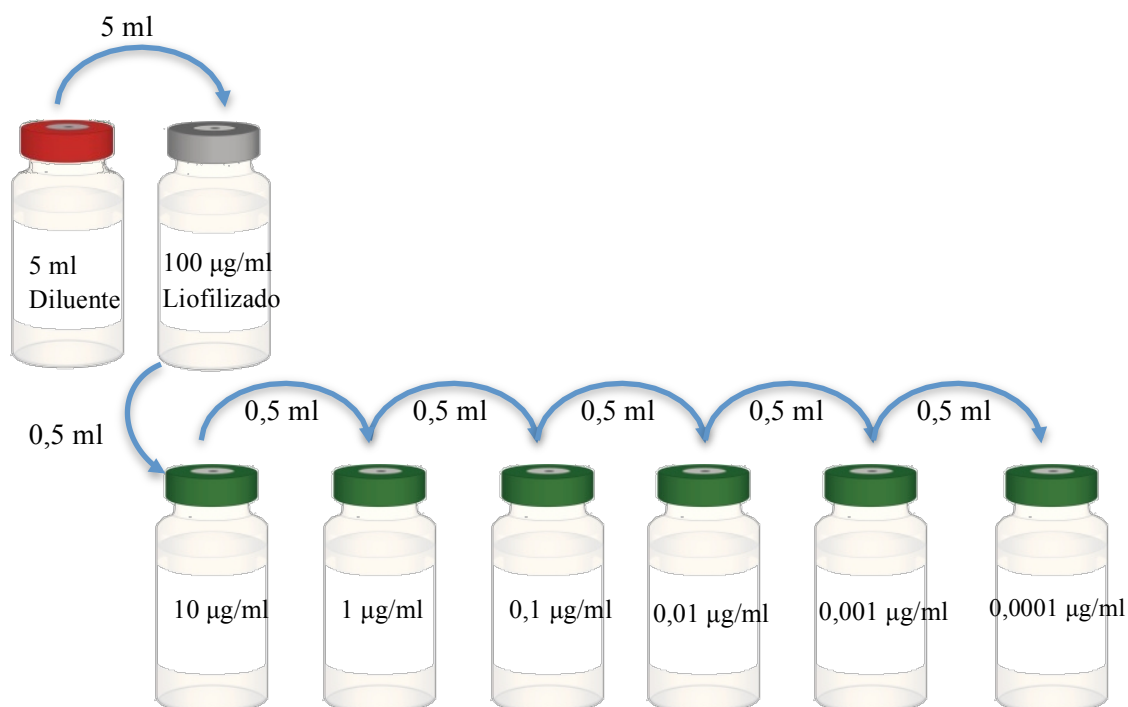
2.2.3. Testes intradérmicos para veneno de himenópteros

Para a realização dos testes intradérmicos foi necessário preparar os alergenios e inoculá-los nos pacientes.

- 1º PROCEDIMENTO - PREPARAÇÃO

Realizou-se a reconstituição dos extratos liofilizados de veneno (500µg) em solvente específico (5ml) contendo solução salina com fenol a 0,5% e albumina sérica humana A a 0,03% (Bial-Aristegui[®], Bial- Industrial Farmaceutica S.A., Zamudio, Espanha) para os três distintos extratos (*Apis Melifera*, *Vespidae*, *Polistes*). Desta forma, obtivemos uma concentração inicial para os três extratos de 100 µg/ml. Realizámos diluições seriadas de 1:10, com a diluição anterior (0,5ml) e com o solvente específico (4,5ml de solução salina fenolada a 0,5% e albumina sérica humana A 0,03%) (Figura 24). Desta forma, foram obtidas as diluições de 10 µg/ml; 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml; 0,0001 µg/ml, a partir da solução original, como se pode observar na figura seguinte.

FIGURA 24. ESQUEMA DE PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES A UTILIZAR NOS TESTES INTRADÉRMICOS



Todo o processo foi realizado numa câmara de fluxo laminar (Aura-VF48, Bioair[®], via Staffora, Itália) e tendo todos os cuidados necessários para não contaminar as amostras.

- 2º PROCEDIMENTO - INOCULAÇÃO

Como referido anteriormente, tanto quanto sabemos, não existe um protocolo definido para a realização dos testes intradérmicos com veneno de himenópteros em animais e, como tal, este protocolo foi executado com base na técnica recomendada para os alergénios ambientais (Reedy, Miller & Willemse, 1997; Hillier & DeBoer, 2001; Martins, 2010; Jackson & Müller, 2012; Matias, 2013) e tendo também por base as poucas referências bibliográficas existentes em medicina veterinária relativamente aos testes intradérmicos para himenópteros (Boord, Griffin & Rosenkrantz, 2005; Bryden, 2009). Contudo, tendo por base um estudo sobre a segurança e eficácia da realização de testes intradérmicos em simultâneo em pacientes humanos (Strohmeier *et al.*, 2013), os autores do presente trabalho optaram por realizar a inoculação de três alergénios em simultâneo. Assim, de forma sucinta, o procedimento foi o seguinte:

1. Os animais, que se encontravam em jejum de pelo menos 12h, foram cateterizados e sedados com 5 µg/kg de dexmedetomidina (Dexdomitor[®]; Zoetis) por via intramuscular;

2. Após colocação do paciente em decúbito lateral, realizou-se cuidadosamente tricotomia de uma área retangular com cerca de 5 cm por 5 cm, na zona lateral do tórax, evitando-se zonas de pele lesionada;

3. Assinalou-se a posição de cada um dos alérgenos com um marcador, com a distância de 2 a 3 cm entre cada um;

4. Utilizou-se histamina (0,0275mg/dl) como controlo positivo e uma solução salina fenolada a 0,5% com albumina sérica humana A a 0,03% como controlo negativo;

5. As inoculações intradérmicas foram realizadas com o auxílio de seringas de 1,0 ml e com agulhas de 27 *gauge*. Após rejeição das bolhas de ar contidas nas seringas, injetou-se um volume de cerca de 0,05 ml de cada uma das soluções dos controlos e dos alérgenos;

6. Os três alérgenos (*Apis melífera*, *Vespula spp.*, *Polistes spp.*) foram testados simultaneamente, sendo que as inoculações de concentrações crescentes dos alérgenos foram feitas de forma gradual e progressiva, iniciando-se pela concentração mais baixa de 0,0001 µg/ml. Caso não houvesse resposta após 15 minutos, injetava-se a concentração seguinte (0,001 µg/ml) e aguardavam-se mais 15 minutos. E assim sucessivamente com as outras concentrações (0,01 µg/ml; 0,1 µg/ml) até perfazer a concentração máxima de 1 µg/ml. No caso de resposta positiva a alguma das concentrações, não eram realizadas as restantes concentrações superiores.

7. A resposta foi avaliada, recorrendo-se a um método subjetivo e objetivo que teve em consideração a avaliação do tamanho e turgidez da pápula, assim como a dimensão do eritema. A leitura das reações foi feita 15 minutos após injeção. Cada reação cutânea foi classificada numa escala de 0 (-) a 4 (++++), em que o “0” corresponde a uma resposta igual à do controlo negativo e o “4” a uma reação igual à do controlo positivo, tendo-se considerado como positivas todas as reações com classificação igual ou superior a “2”. Em caso de dúvida, as pápulas eram contornadas com um marcador para uma melhor avaliação. Por convenção, a reação ao teste é considerada objetivamente positiva, quando o diâmetro do halo eritematoso formado é pelo menos igual ou maior que a média entre o diâmetro dos halos formados pelo controlo negativo e pelo controlo positivo (Miller, Griffin & Campbell, 2013).

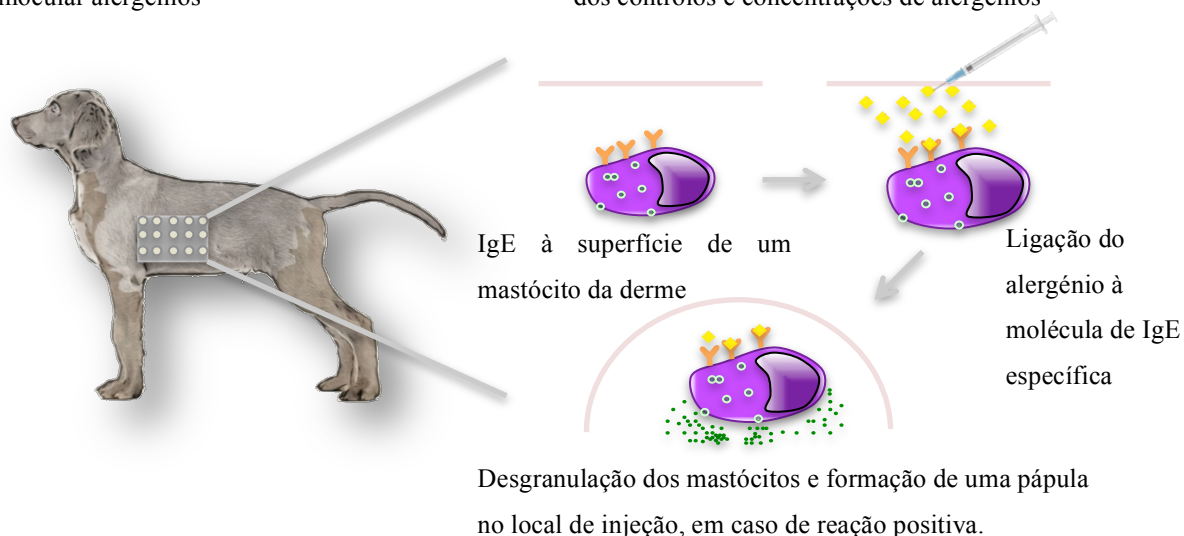
8. Foram apenas considerados válidos os testes cujo local de injeção da histamina formou uma pápula de turgidez e eritema visíveis e cujo local de inoculação do controlo negativo não revelou qualquer reação.

FIGURA 25. ESQUEMA SIMPLIFICADO DO PROCEDIMENTO E MECANISMO DE AÇÃO DOS TESTES INTRADÉRMICOS

(ADAPTADO DE MARTINS, 2010)

(1) Sedação e preparação do local para inocular alérgenos

(2) Realização de injeções intradérmicas de 0,05 ml dos controlos e concentrações de alérgenos



2.3. Resultados

2.3.1. Caracterização da amostra

Foram observados e recrutados para o estudo animais suspeitos de terem sido picados por abelhas e terem tido reações alérgicas à picada. No total, 10 cães com anamnese compatível com reação alérgica à picada por himenópteros foram incluídos no estudo e 7 cães foram usados como controlo. No total destes, 50% eram machos. Neste estudo 9 cães eram de raça pura e 8 eram de raça indeterminada.

Todos os cães alérgicos e controlos incluídos neste estudo são residentes na área da Grande Lisboa e Península de Setúbal.

As reações alérgicas à picada de himenópteros nos animais suspeitos foram classificadas de acordo com o critério de Müller (1966). Nenhum dos pacientes do estudo teve reações do grau I, 8 tiveram reações do grau II, um do grau III e um do grau IV.

2.3.1.1 CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS ALÉRGICOS À PICADA

As características dos pacientes alérgicos à picada encontram-se descritas na tabela 8.

TABELA 8. CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS ALÉRGICOS À PICADA INCLUÍDOS NO ESTUDO

Paciente	Raça	Sexo	Peso (Kg)	Idade aquando reação	Tipo de reação alérgica (Grau de acordo com Muller)
Paciente 1 (Sebastião)	Weimaraner	Macho	30,3	2 anos	Angioedema moderado Vômito (Grau II)
Paciente 2 (Amora)	Bulldogue Francês	Fêmea	12,2	1 anos e 6 meses	Angioedema ligeiro (Grau II)
Paciente 3 (Dexter)	Indeterminada	Macho	32	2 anos e 2 meses	Angioedema grave (Grau II)
Paciente 4 (Brownie)	Labrador Retriever	Fêmea	25	1 ano e 6 meses	Angioedema grave, Vômito (Grau II)
Paciente 5 (Cookie)	Labrador Retriever	Fêmea	26,3	1 ano	Angioedema moderado (Grau II)
Paciente 6 (Leia)	Indeterminada	Fêmea	22,9	1 ano e 6 meses	Angioedema moderado (Grau II)
Paciente 7 (Laika)	Golden Retriever	Fêmea	35	3 anos	Angioedema moderado (Grau II)
Paciente 8 (Tobby)	Indeterminada	Macho	20	8 meses	Angioedema múltiplo, Dispneia, Sincope (Grau IV)
Paciente 9 (Egas)	Indeterminada	Macho	19,4	1 ano	Angioedema grave, Dispneia (Grau III)
Paciente 10 (Night)	Indeterminada	Fêmea	23	1 ano e 3 meses	Angioedema ligeiro (Grau II)

2.3.1.2 DISTRIBUIÇÃO POR GÉNERO DOS ANIMAIS ALÉRGICOS À PICADA

Como se pode verificar na tabela 9, houve predominância de fêmeas neste estudo. Dos 10 animais selecionados, 6 eram fêmeas (60%) e 4 eram machos (40%).

TABELA 9: DISTRIBUIÇÃO POR GÉNERO DOS ANIMAIS ALÉRGICOS À PICADA (%)

Macho	Fêmea
40%	60%

2.3.1.3 DISTRIBUIÇÃO RÁCICA DOS ANIMAIS PICADOS

Na tabela 10 encontram-se os dados relativos à distribuição das raças dos animais picados deste estudo. Podemos observar que as reações alérgicas surgiram em animais de raça (5) e em animais indeterminados (5) em igual proporção.

TABELA 10: DISTRIBUIÇÃO POR RAÇA (NÚMERO DE PACIENTES)

Weimaraner	Bulldogue Francês	Labrador Retriever	Golden Retriever	Indeterminada
1	1	2	1	5

2.3.1.4 DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DOS ANIMAIS ALÉRGICOS AQUANDO DA PICADA

Relativamente à distribuição etária aquando da picada na população em estudo (tabela 11), podemos verificar o predomínio de adultos jovens (>6 meses ≤ 2 anos) nesta amostra, encontrando-se também presentes 2 animais adultos.

TABELA 11: DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DOS ANIMAIS ALÉRGICOS AQUANDO A PICADA

Faixa etária	Nº de casos
Cachorro (≤ 6 meses)	0
Adulto jovem (>6 meses ≤ 2 anos)	8
Adulto (> 2 anos ≤ 8 anos)	2
Geriátrico (> 8 anos)	0

2.3.1.5 CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS CONTROLO INCLUÍDOS NO ESTUDO

Na tabela 12 encontram-se os dados relativos aos animais controlo deste estudo.

TABELA 12. CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS CONTOLO INCLUÍDOS NO ESTUDO

Paciente	Raça	Sexo	Peso (Kg)	Idade	Tem algum tipo de alergia?	Sabe como prevenir uma reação alérgica?
Paciente 11 (Zara)	Indeterminado	Fêmea	15,4	4 anos	Não	Não
Paciente 12 (Baus)	Indeterminado	Macho	28	4 anos	Sim	Não
Paciente 13 (Raquel)	Indeterminado	Fêmea	9,5	3 anos	Não	Não
Paciente 14 (Gaspar)	Podengo Português	Macho	20	6 anos	Não	Não
Paciente 15 (Sacha)	Pastor alemão	Macho	28,3	7 anos	Não	Não
Paciente 16 (Shott)	Buldogue Francês	Macho	12	2 anos	Sim	Não
Paciente 17 (Matilde)	Weimaraner	Fêmea	28,3	2 anos	Não	Sim

Dos pacientes controlo 58% eram machos e encontram-se presentes 4 animais de raça pura e 3 de indeterminada .

2.3.2. Anamnese dos pacientes

Em relação aos resultados dos inquéritos realizados presencialmente aos donos dos cães alérgicos picados verificámos que:

- i. A percentagem de animais com outro tipo de alergias e a de animais considerados não alérgicos, ou pelo menos de que não se tenha conhecimento, são bastante próximas. 60% dos animais tem outro tipo de alergias.
- ii. Relativamente à urgência com que os donos se apresentaram ao veterinário, 70% afirmou que foi de urgência ao veterinário.
- iii. Quanto ao agente culpado, 80% desconhece qual ao certo o inseto envolvido na picada.
- iv. Nas percentagens apresentadas relativamente aos conselhos dados pelo veterinário verifica-se que 70% não sabe como prevenir as próximas picadas e ainda que 70% não possui qualquer tipo de medicação para usar em S.O.S.
- v. Neste estudo, a maioria dos cães alérgicos às picadas são cães de exterior (80%).
- vi. Neste estudo, em média, os donos têm as clínicas veterinárias muito próximas do lugar dos incidentes (<5km), os animais foram picados entre 1 e 2 vezes no máximo e o grau de preocupação dos donos após a picada e face aos sinais apresentados por um animal alérgico situa-se nos 4, numa escala de 1 a 5.

TABELA 13: RESULTADOS DOS INQUÉRITOS AOS DONOS DOS PACIENTES ALÉRGICOS AOS HIMENÓPTEROS DESTE ESTUDO.

Questão	Sim (%)	Não (%)
Alérgico a mais alguma coisa exceto picada de abelhas/ vespas?	60	40
Foi de urgência ao veterinário?	70	30
Sabe quem foi o agente culpado (abelha, vespa, <i>Poliste</i>)?	20	80
Foram dados conselhos para a prevenção?	30	70
Tem alguma medicação para usar em S.O.S.?	30	70
Cão de exterior?	80	20
Respostas (Médias)		
Distância do veterinário mais próximo (km)?	< 5 km	
Quantas vezes foi picado?	1,43 vezes	
Grau de preocupação após picada?	4 (numa escala de 1 a 5)	

2.3.3. Testes intradérmicos para veneno de himenópteros

Nesta fase do estudo não foram registadas quaisquer reações adversas sistémicas, tendo-se verificado, apenas em alguns casos, algum grau de prurido associado às pápulas típicas dos testes cutâneos. Após a sessão, este problema foi controlado com recurso a corticosteróide tópico, em todos os casos.

Os testes intradérmicos realizados nos cães alérgicos foram considerados válidos na sua totalidade, uma vez que, em todos eles, a injeção da solução correspondente ao controlo negativo não originou qualquer tipo de reação cutânea visível e a solução correspondente ao controlo positivo deu origem a uma reação positiva, em que foi visível a turgidez da pápula e o respetivo halo eritematoso (figura 26).

FIGURA 26. TESTES INTRADÉRMICOS POSITIVOS PARA VENENO DE HIMENÓPTEROS



Foram realizadas até um total de 17 inoculações intradérmicas, 5 de concentrações crescentes de cada um dos três venenos e 2 de controlo (positivo e negativo) em cada um dos canídeos. A distribuição das reações positivas e negativas nos cães alérgicos a determinadas concentrações dos três venenos encontram-se descritas na tabela 14. Os animais do número 1 ao número 10 representam a amostra relativa aos animais com reações alérgicas à picada por himenópteros e os do número 11 ao número 18 constituem o grupo controlo.

Os quadrados a cinzento correspondem às concentrações que não foram prosseguidas pela positividade da reação precedente.

TABELA 14: ALERGÉNIOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES AVALIADAS NOS TESTES INTRADÉRMICOS

Resposta às concentrações de alérgenos nos testes intradérmicos															
Alergénio/ Paciente	A1 *	A2 **	A3 ***	A4 ****	A5 *****	V1 ⁺ ++	V2 +++	V3 ++++	V4 +++++	V5 +++++	P1 ◇	P2 ◇◇	P3 ◇◇◇	P4 ◇◇◇◇	P5 ◇◇◇◇◇
Paciente 1	X	X	X	+++		X	X	X	++		X	X	X	++	
Paciente 2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	+
Paciente 3	X	X	++++			X	X	X	X	++	X	X	X	X	X
Paciente 4	X	X	X	+++		X	X	X	+++		X	X	X	++	
Paciente 5	X	X	X	+++		X	X	X	X	+++	X	X	X	X	X
Paciente 6	X	X	X	++		X	X	X	X	X	X	X	X	++	
Paciente 7	X	X	X	X	++	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 9	X	X	X	X	+++	X	X	X	X	+++	X	X	X	X	+++
Paciente 10	X	X	X	X	++	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Paciente 17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

* *Apis melífera* 0,0001µg/ml
 ** *Apis melífera* 0,001µg/ml
 *** *Apis melífera* 0,01µg/ml
 **** *Apis melífera* 0,1µg/ml
 ***** *Apis melífera* 1µg/ml

+ *Vespula* 0,0001µg/ml
 ++ *Vespula* 0,001µg/ml
 +++ *Vespula* 0,01µg/ml
 ++++ *Vespula* 0,1µg/ml
 +++++ *Vespula* 1µg/ml

◇ *Polistes* 0,0001µg/ml
 ◇◇ *Polistes* 0,001µg/ml
 ◇◇◇ *Polistes* 0,01µg/ml
 ◇◇◇◇ *Polistes* 0,1µg/ml
 ◇◇◇◇◇ *Polistes* 1µg/ml

■ - não realizada
 X - negativo
 + - positivo

Como podemos observar pelos resultados da tabela 14, verificamos que:

- O grupo de pacientes controlo (pacientes 11 a 17) não teve qualquer tipo de reação aos testes intradérmicos;
- O paciente 8 não apresentou qualquer positividade às provas cutâneas em nenhum dos três venenos testados;

- À excepção do paciente 8, todos os outros animais suspeitos de alergia aos himenópteros tiveram positividade para um dos extractos alergénicos, no intervalo de concentrações de 0,01 a 1 µg/ml;
- Podemos também verificar que as reacções positivas foram variáveis de animal para animal, tendo alguns deles apresentado reacções máximas (++++), enquanto outros apresentaram reacções mais fracas (+);
- No caso do paciente 2, a reacção não foi suficientemente exuberante para ser considerada muito positiva, apesar de se ter observado alguma reatividade ao veneno de *Polistes*, quando comparada com o controlo negativo;
- Alguns dos pacientes exibiram reacções positivas a pelo menos dois alergénios distintos, com excepção dos pacientes 2, 7 e 10, apenas positivos para um dos alergénios, e do paciente 8, em que não se verificou qualquer tipo de reacção;
- Os pacientes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 10 tiveram reacções positivas para o veneno de *Apis mellifera*, sendo que os pacientes 7 e 10 reagiram em exclusivo a este veneno;
- Nenhum dos pacientes foi alérgico exclusivamente ao veneno de *Vespula*. Os pacientes 1, 3, 4, 5 e 9 reagiram a este veneno;
- Os pacientes reagiram de forma variável ao veneno de *Polistes*, tendo-lhe a maioria sido sensível em conjunto com outros venenos (pacientes 1, 4, 6 e 9) e apenas um (paciente 2) evidenciou uma sensibilização exclusiva;
- Os resultados deste estudo demonstram que 90% dos pacientes com história clínica de reacção alérgica à picada por himenópteros sensibilizaram aos testes intradérmicos.

2.4. Discussão

2.4.1. Caracterização da amostra

Na elaboração deste estudo, os princípios de boa prática clínica foram escrupulosamente respeitados, tendo-se cumprido os critérios de inclusão para obter os resultados o mais fidedignos possível. Critérios como raça, idade, sexo e peso do animal não foram critério de inclusão, de forma a garantir a representatividade da amostra em estudo. Assim, a qualquer dono de um animal que se apresentasse à consulta, com história clínica possível de alergia à picada de himenópteros, e que cumprisse os pressupostos fundamentais deste projeto, era proposta a participação neste estudo.

No que concerne à distribuição por género, os resultados obtidos neste estudo parecem apontar no sentido de que não existe relação entre o género dos animais e a alergia aos himenópteros e de que esta pode surgir igualmente em machos e em fêmeas, sem que isto

afete a gravidade ou frequência das reações. Os resultados encontrados nos animais parecem ir ao encontro dos de medicina humana nos quais, em alguns estudos, não foram encontradas variações no género (Novembre *et al.*, 1998 citado por Krishna *et al.*, 2011).

No que diz respeito à distribuição por raça, os resultados obtidos nesta parte do trabalho vão no sentido de que não existe uma raça mais predisposta à alergia aos himenópteros, apesar do que se encontra descrito na bibliografia (Cowell & Cowell, 1995 citado por Fitzgerald & Flood, 2006; Miller *et al.*, 2013). No desenvolvimento da primeira fase deste trabalho, os dados também apontam neste sentido. Contudo, seria interessante realizar provas cutâneas em mais animais alérgicos aos himenópteros, de maneira a obter uma amostra populacional maior e a conseguir mais dados sobre se a raça influencia ou não a frequência e/ou gravidade das reações.

Relativamente à distribuição etária, este trabalho permitiu identificar que, aparentemente, os jovens adultos (6 meses a 2 anos) estão mais suscetíveis à picada que os mais velhos, já que a maioria dos casos dos animais alérgicos deste trabalho se encontra, de facto, nesta faixa etária. Os dados vão ao encontro dos resultados encontrados na primeira fase deste estudo, onde a maioria dos casos, segundo as clínicas e hospitais veterinários, ocorreu nos jovens adultos, facto amplamente justificado por esta ser a idade da curiosidade e da exploração dos cães (Starling, Branson, Thomson & McGreevy, 2013), o que os predispõe mais às picadas. Neste trabalho não conseguimos estabelecer se existe alguma relação da gravidade das reações com a idade mais avançada (Chipps, Valentine, Kagey-Sobotka, Schuberth & Lichtenstein, 1980, Lockey *et al.*, 1988), na medida em que a maioria dos pacientes em estudo foram picados e tiveram reações alérgicas na faixa etária dos 6 meses a 2 anos, apresentando maioritariamente reações de grau II. Os únicos animais fora desta faixa etária também apresentaram reações de grau II e, como tal, não se conseguiu identificar se a idade influencia ou não a gravidade das reações em cães.

No que se refere à reação mais frequentemente observada, abordada também na primeira fase deste trabalho, foi possível verificar que os dados encontrados nos pacientes deste estudo vão ao encontro do constatado na bibliografia (Miller *et al.*, 2013) e dos dados obtidos a partir dos inquéritos às clínicas, ou seja, que o sinal clínico mais frequentemente observado é o angioedema (grau II de Müller (1966)).

2.4.2. Anamnese dos pacientes

O objetivo principal do inquérito, como referido anteriormente, era obter uma anamnese útil e completa, retirando algumas ilações, não só sobre a possibilidade de realmente se tratar de uma alergia por picada, como também sobre qual a sintomatologia e qual a decisão do que fazer após a picada. Pretendia-se também identificar se os donos estão ou não informados da prevenção que podem fazer para evitar este problema. Foi ainda colocada uma questão sobre outro tipo de

alergias, de modo a entender se as outras manifestações alérgicas se encontram ou não relacionadas com a alergia a venenos de himenópteros.

No que diz respeito a esta última parte, os resultados deste estudo relativos a animais alérgicos a picada por himenópteros apontam para uma proximidade das percentagens de animais com outras doenças alérgicas *versus* animais não alérgicos. A questão foi ainda colocada aos donos de cães do grupo controlo, de maneira a tentar identificar se existia esta relação. O grupo controlo apresentou respostas negativas aos testes, quer em animais alérgicos, quer em animais não alérgicos.

Relativamente à urgência com que os donos se apresentaram ao veterinário, 67% afirmaram que foram de imediato ao veterinário para resolver o problema. A percentagem até poderia ser maior, se tivermos em conta que 2 dos donos dos pacientes que deram resposta negativa são médicos veterinários e sabem como agir nesta situação, tendo por isso recorrido a medicamentos de urgência que tinham na sua posse. Estes dados parecem confirmar que a alergia à picada de himenópteros é realmente uma situação de urgência em veterinária (Fitzgerald & Flood, 2006), estando também relacionada com o grau de preocupação dos donos que, neste caso concreto, foi elevado (4 em 5). Seria interessante ter mais casos para melhorar a informação sobre o rigor desta avaliação.

No que concerne ao agente incriminado, 83% dos donos desconhece se o responsável é mesmo um himenóptero e qual a sua espécie. Estes resultados encontrados são compatíveis com o que se sabe em medicina veterinária, já que a maioria das picadas não é presenciada e nem sempre é possível verificar a presença ou não do ferrão no animal, para identificação da espécie (Fitzgerald & Flood, 2006). Novamente, na primeira fase deste trabalho foram encontrados dados que suportam esta situação.

No que diz respeito aos conselhos dados aos donos sobre a prevenção e medicação de urgência a usar, no caso específico destes pacientes, podemos observar que 67% dos donos não sabem como prevenir as picadas e não têm informações ou medicamentos para usar, caso exista uma urgência e não consigam recorrer a serviços médico-veterinários, nomeadamente, se estiverem em meio rural de férias, longe do veterinário mais próximo. Estes dados são compatíveis com os dados encontrados na primeira fase do trabalho em relação aos conselhos dados aos donos. Porque era interessante avaliar se os donos de animais que nunca foram picados por himenópteros sabem como prevenir este possível problema, foi questionado aos donos dos animais controlo se sabiam prevenir uma reação alérgica à picada por himenópteros. Apesar de um dos donos afirmar que sim, a maioria não sabe efetivamente o que fazer.

Neste estudo foi ainda possível observar que a maioria dos cães picados vive no exterior. Se pensarmos que a maioria dos himenópteros habita no exterior, então podemos pensar que os animais de exterior são mais predispostos a ser picados do que os animais de interior, ou seja, que grande parte das picadas acontecem no exterior, mesmo que o cão eventualmente seja de interior

(por exemplo, o paciente 9 deste estudo). Novamente na primeira parte deste trabalho são apresentados dados que suportam esta ideia.

2.3.3. Testes intradérmicos para veneno de himenópteros

Os resultados obtidos neste estudo comprovam que os testes intradérmicos podem ser utilizados com segurança em medicina veterinária. O nosso grupo controlo não apresentou qualquer tipo de reações às concentrações iguais ou inferiores a 1 µg/ml, sendo possível assumir que, a existirem reações irritantes nos cães elas deverão acontecer em concentrações de alergénio de veneno superiores a 1 µg/ml. Estudos futuros poderão determinar quais são as concentrações de veneno irritantes nos cães, e se estas são semelhantes ao descrito em medicina humana.

Os resultados comprovam também que foram observadas reações de hipersensibilidade em animais com suspeita e anamnese compatíveis com alergia à picada por himenópteros, tendo quase todos os pacientes destes testes apresentado sensibilização a pelo menos um dos alergénios. A exceção a estes resultados é o paciente 8.

De facto, apesar de ter uma história compatível com ter sido previamente picado, neste caso em concreto, picado múltiplas vezes por um enxame de vespas, as provas cutâneas do paciente 8 foram negativas para os três venenos. Existem algumas justificações para esta situação. Em primeiro lugar, o paciente foi picado aos 8 meses e, no momento das provas cutâneas, tinha 7 anos, o que pode justificar a perda de sensibilização pelo tempo passado desde a picada (Biló *et al.*, 2005; Golden, 2007). Em segundo lugar, será necessário considerar que o canídeo poderá ter tido uma reação tóxica não mediada por IgE, devido às múltiplas picadas do enxame. Embora alguns dos sinais clínicos deste paciente sejam compatíveis com este tipo de reação, a presença de angioedema é normalmente mais compatível com reações mediadas por IgE e não é muito comum na reação tóxica. Contudo, encontra-se descrito um caso de dois animais que tiveram este tipo de reação tóxica à picada e que apresentavam concomitantemente angioedema (Waddell & Drobatz, 1999). Para identificar se este animal é realmente negativo, seria necessário recorrer a novas provas cutâneas ou a testes serológicos, de preferência *immunoblotting* ou doseamento de IgE específicas (Krishna *et al.*, 2011).

Ainda que os resultados tenham sido motivadores na identificação dos animais alérgicos à picada por himenópteros e que a maioria dos animais tenha respondido ao agente suspeito, nos casos em que o mesmo foi identificado pelos donos, devemos ser cautelosos com a interpretação dos resultados. Isto porque, além do agente suspeito referido pelos donos, em alguns dos casos houve também resposta dupla a dois ou até a três dos venenos testados.

Podem existir diversas causas para explicar este facto. Em primeiro lugar e como verificado na primeira e segunda fase deste trabalho, a maioria das picadas não é testemunhada e, quando o é, os

donos não conseguem ter a certeza do agente responsável. Sabendo então que alguns dos pacientes foram picados mais do que uma vez e apresentaram reação (pacientes 1, 6 e 9), é possível concluir que as várias picadas talvez tivessem agentes responsáveis distintos.

Em segundo lugar, devemos ter em consideração que os venenos de *Vespula* e de *Polistes* são bastante semelhantes na sua composição e que os alergénios responsáveis pelas reações são também idênticos (tabela 2). Num artigo recentemente publicado, foi descrito que, em alguns pacientes humanos que apresentavam dupla positividade ao veneno de *Vespula* e de *Polistes* nas provas cutâneas, os pacientes eram positivos para apenas um dos venenos, quando usados testes serológicos avançados por estudos de inibição (Savi, Peveri, Makri, Pravettoni & Incorvaia, 2016). Podemos assim esperar algum tipo de reação cruzada entre estes dois géneros de venenos, ou seja, temos de considerar que alguns dos animais podem não ser “verdadeiramente” alérgicos a ambos os venenos e que algumas das reações deles são resultado da reação cruzada.

Por último e ainda relacionado com a reação cruzada, segundo Spillner, Blank e Jakob (2014), os resultados positivos, nas provas cutâneas com extratos de veneno convencionais, nem sempre refletem uma sensibilização genuína e podem ser causados por anticorpos envolvidos em reações cruzadas. Ou seja, desde que existam compostos semelhantes no veneno, a reação cruzada imunológica, que não clínica, pode ocorrer. No entanto, outros autores assumem que os testes intradérmicos em pacientes humanos raramente demonstram duplos positivos, principalmente entre os venenos de abelhas e de vespas (Krishna *et al.*, 2011), algo que não se verificou nos cães deste estudo. Neste estudo observamos que 6 dos 10 pacientes sensibilizaram para múltiplos alergénios e que 5 (pacientes 1, 3, 4, 5 e 9) reagiram ao veneno de *Apis mellifera* e *Vespula*. Se relativamente aos pacientes 1, 4 e 9 a história pode explicar esta situação (múltiplas picadas por distintos agentes), nos pacientes 3 e 5 a história não corrobora os achados, na medida em que os donos apenas referiram a reação do paciente apenas uma vez. A confirmação por testes serológicos avançados, por exemplo com o ImmunoCAP®, seria necessária para verificar se os pacientes são realmente positivos ou se os animais apresentam reações cruzadas entre veneno de *Apis mellifera* e o veneno de *Vespula*, ao contrário do que atualmente é referido nas *guidelines* da BSACI para os pacientes humanos (Krishna *et al.*, 2011). Um estudo mais recente (Müller, Schmid-Grendelmeier, Hausmann & Helbling, 2012) refere ainda como possibilidade o facto de a dupla positividade poder ser o resultado de uma sensibilização a uma picada anterior bem tolerada, sendo que neste caso esta possibilidade também não pode ser excluída.

É de extrema importância obter o diagnóstico definitivo e identificar, ao certo, a qual dos agentes o paciente é verdadeiramente alérgico, no sentido de se iniciar imunoterapia específica para o correto alergénio do veneno de himenóptero específico e para assim melhorar a qualidade de vida do paciente.

Ainda no que respeita ao grupo dos animais alérgicos, o paciente 2 teve apenas uma pequena sensibilização ao veneno de *Polistes*. Embora seja de fraca intensidade, encontra-se descrito na bibliografia que o grau de sensibilidade dos testes cutâneos não se relaciona com o grau de reação à picada e que um animal com uma reação grave pode ter uma fraca sensibilização (Golden, 2007). Ou seja, apesar da fraca sensibilização neste caso, o animal deve ser considerado alérgico. Para confirmar o diagnóstico, poderia ser necessário realizar novos testes cutâneos após dois meses ou realizar testes serológicos.

Nos resultados deste trabalho verificou-se também que os animais sensibilizaram nos intervalos de concentrações de 0,01 a 1 µg/ml. Estes resultados encontram-se dentro do intervalo do *proceeding* referido, em que, segundo Boord, Griffin e Rosenkrantz (2005), o intervalo de concentrações se situou entre os 0.001 e os 10 µg/ml. Os autores optaram por não realizar concentrações mais altas que 1 µg/ml, já que em medicina humana a sensibilidade dos testes intradérmicos foi estimada em 90% ou mais para a concentração de 1 µg/ml (Biló *et al.*, 2005) e, segundo Golden *et al.* (2011), concentrações iguais ou mais baixas que 1 µg/ml demonstram eficazmente a presença de anticorpos IgE específicos. Também, embora as concentrações de venenos que causam reações irritantes nos animais não sejam conhecidas, sabe-se que, em medicina humana, concentrações superiores a 1 µg/ml são responsáveis por reações não específicas e irritativas, não sendo, por isso, possível distinguir pacientes não alérgicos de pacientes alérgicos, ou seja, diminui muito a especificidade dos testes (Reisman, 2012).

Finalmente, os resultados deste estudo demonstram que 90% dos pacientes com história clínica compatível sensibilizaram aos testes intradérmicos, o que nos leva a crer que os testes intradérmicos são bastante úteis no diagnóstico e confirmação das alergias à picada de himenópteros em cães. Os resultados parecem ainda confirmar que, assim tal como nas pessoas, os cães também sensibilizam ao veneno de himenópteros, podendo manifestar-se como uma doença alérgica de impacto significativo.

3. Conclusões

A realização deste trabalho permitiu obter vários dados sobre a alergia à picada por himenópteros em cães, quer relativamente ao panorama nacional, quer em relação ao diagnóstico. Contudo, muito ainda falta saber, em medicina veterinária, sobre este tema que tem ganho cada vez mais importância em medicina humana.

A partir dos dados recolhidos pelos inquéritos às clínicas e hospitais do país, foi-nos permitido concluir que os cães são mais frequentemente picados na região do focinho, que o sinal clínico mais frequente é o angioedema e que não parece existir uma predisposição racial para este tipo

de alergia. Verificámos ainda que os indivíduos frequentemente se encontram na faixa etária dos 6 meses aos 2 anos, que as picadas ocorrem maioritariamente na primavera-verão, que são mais frequentes em cães de exterior e que os proprietários dos animais não sabem qual o agente envolvido na picada. No que respeita aos tratamentos e prevenção para este tipo de alergia, a maior parte dos clínicos usa os corticoesteróides para tratar este tipo de reações e a maioria dos donos desconhece como prevenir este problema. Foi ainda possível observar que, ao contrário do que se passa em medicina humana, os apicultores e as zonas de apicultura não parecem desempenhar um papel importante neste tipo de alergias em cães, já que o maior número de abelhas (*Apis mellífera*) por região não parece condicionar o número de animais alérgicos picados. De futuro, seria interessante expandir o estudo a mais clínicas e hospitais, de forma a perceber qual será a prevalência desta doença no nosso país em animais de companhia, se existe alguma relação entre os animais com outro tipo de alergias e a alergia aos himenópteros e ainda se a prevalência de casos é ou não maior em cães de caçadores.

No que respeita ao diagnóstico, demonstramos que os testes intradérmicos podem ser utilizados, nas concentrações descritas, com segurança nos animais com história compatível de alergia a himenópteros e que são úteis no sentido de saber se os animais são alérgicos ou não. Apesar da maioria dos animais sensibilizar a pelo menos um veneno, existem casos de pacientes que não respondem aos testes, principalmente se forem realizados muito tempo depois da picada. Também devemos ser criteriosos na interpretação dos resultados, na medida em que, por um lado, as reações cruzadas podem acontecer e, por outro, embora as provas cutâneas sejam altamente sensíveis em medicina humana, o mesmo poderá não acontecer nos animais. É extremamente difícil saber, a partir da anamnese, qual dos himenópteros foi responsável pela alergia e quantas vezes o animal foi de facto picado.

Foi ainda possível concluir neste trabalho que, tal como em medicina humana, é seguro e eficaz realizar inoculações simultâneas de veneno nos testes intradérmicos, tendo também sido possível observar que a maioria dos animais sensibiliza nos intervalos de concentrações de 0,01 a 1 µg/ml. Parece então que, assim como nas pessoas, os cães também sensibilizam ao veneno de himenópteros. Estudos futuros e testes serológicos mais avançados poderão dar mais informações no sentido de saber a quais dos alergénios específicos os animais reagem mais e se existem de facto reações cruzadas ou se, na realidade, os animais tendem a apresentar com maior frequência duplas ou triplas positivities, contrariamente aos pacientes humanos. Estudos futuros poderão ainda desenvolver o conhecimento relativamente à imunoterapia específica de himenópteros em medicina veterinária, no que respeita à duração ideal e ao melhor protocolo de imunoterapia.

Bibliografia

- Akdis, C.A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B. & Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, 102, 98-106.
- Alves, R.R., Baptista, M., Melo, A., Soares, R., Pedro, E., Barbosa, M.P., Victorino, R., Sousa, A.E. & Santos, M.C.P. (2008). Alergia ao veneno de himenópteros: Mecanismos envolvidos na resposta à imunoterapia específica. *Revista Portuguesa Imunoalergologia*, 16(6), 535-552.
- Antonicelli, L., Biló, M.B., Napoli, G., Farabollini, B. & Bonifazi, F. (2003). European hornet (*Vespa crabro*) sting: a new risk factor for life-threatening reaction in hymenoptera allergic patients?. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 35(6), 199-203.
- Annala, I. (2000). Bee venom allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 30 (12), 1682-1687.
- Annala, I., Saarinen, J.V., Nieminen, M.M., Moilanen, E., Hahtola, P. & Harvima, I.T. (2000). Bee venom induces high histamine or high leukotriene C4 release in skin of sensitized beekeepers. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 10, 223-228.
- Banks, B.E.C. (1986). The composition of Hymenoptera venoms with particular reference to venom of the honeybee. In F. Kornalik & D. Mebs (eds.), *Proceedings of the 7th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins*, Prague.
- Barthélémy, C. (2008). A Provisional Identification Guide to the Social Vespids of Hong Kong (Hymenoptera: Vespidae); 17-18. Acedido em Set. 15, 2015, disponível em: <http://insectahk.com/HK-Vespids.Rev.M%20Web.pdf>
- Benson, R.L. & Semenov, H. (1930). Allergy in its relation to bee sting. *Journal of Allergy*, 1, 105-116.
- Biló, B.M., Rueff, F., Mosbech, H., Bonifazi, F., Oude-Elberink, J.N., Birnbaum, J., Bucher, C., Forster, J., Hemmer, W., Incorvaia, C., Kontou, F.K., Gawlik, R., Müller, U., Fernandez, J., Jarish, R., Jutel, M., Wuthrich, B. (2005). Diagnosis of hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 60(11), 1339-1349.
- Biló, M.B. (2011). Anaphylaxis caused by hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. *Allergy*, 66, 35-37.
- Birnbaum, J., Vervloet, D. & Charpin, D. (1994). Atopy and systemic reactions to hymenoptera stings. *Allergy Proceedings*, 15(2), 49-52.
- Bjorkander, J. & Belin, L. (1980). Diagnostic skin testing in hymenoptera sensitivity. In Oehling, A. (ed): *Advances in allergology and applied immunology*. New York, Pergamon Press., 733.
- Blanca, M., Garcia, F., Miranda, A., Carmona, M.J., Garcia, J., Fernandez, J., Terrados, S., Vega, J.M., Juarez, C. (1991). Determination of IgE antibodies to *Polistes dominulus*, *Vespula germanica* and *Vespa carbo* in sera of patients allergic to vespids. *Allergy*, 46, 109-114.
- Blank, S., Seismann, H., Bockirsch, N., Braren, I., Cifuentes, L., McIntyre, M., Rühl, D., Ring, J., Bredehorst, R., Ollert, M.W., Grunwald, T. & Spillner, E. (2010). Identification, recombinant

- expression, and characterization of the 100kDa high molecular weight hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v3. *Journal of Immunology*, 184(9), 5403-5413.
- Bonadonna, P., Zanotti, R. & Müller, U. (2010). Mastocytosis and insect venom allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10, 347-353.
- Bonifazi, F., Jutel, M., Biló, M.B., Birnbaum, J. & Müller, U. (2005). Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 60(12), 1459-1470.
- Boord, M.J., Griffin, C.E. & Rosenkrantz, W.S. (2005). Sensitivity to hymenoptera venom before and after hymenoptera immunotherapy. In B.A. Harrison, *Proceedings of North American Veterinary Dermatology Forum, 6-10 April, 2005, Sarasota, Florida*, pp-197.
- Boord, M.J. (2014). Venomous insect hypersensitivity, in C. Noli, A. Foster & R. Wayne (Eds.), *Veterinary Allergy*. (pp.191-194). Chichester, West Sussex, UK, Wiley Blackwell.
- Bousquet, J., Menardo, L., Aznar, R., Robinet-Levy, M. & Michel, F.B. (1984). Clinical and immunologic survey in beekeepers in relation to their sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73, 332-340.
- Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., Plaut, M., Cooper, S.F., Fenton, M.J., Arshad, S.H., Bahna, S.L., Beck, L.A., Bryd-Bredbenner, C., Camargo Jr., C.A., Eichenfield, L., Furuta, G.T., Hanifin, J.M., Jones, C., Kraft, M., Levy, B.D., Liberman, P., Luccioli, S., McCall, K.M., Schneider, L.C., Simon, R.A., Simons, F.E.R., Teach, S.J., Yawn, B.P. & Scwaninger, J.M. (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the united states: report of the NIAID- sponsored expert panel. *Journal of Allergy and clinical Immunology*, 126(6), S1-S58.
- Braun, L.I.B. (1925). Notes on desensitization of a patiente hypersensitive to bee sting. *The South Africa Medical Record*, 23, 408.
- Bryden, S. (2009). Venom allergy in dogs: A multicentre retrospective study. In Austalian & New Zealand College of Veterinary Scientists (Eds.), *ACVS Dermatology Chapter Science Week Proceeding 2009, 3-4 July*. Acedido 15 Set., 2014, disponível em: http://dermatology.anzcvcs.org.au/dermatology_assets/documents/proc2009/acvs%20dermatology%20chapter%20proceedings%202009%20-%20bryden%20-%20venom%20allergy.pdf.
- Bushmann, S.L. & Drummond, F.A. (2015). Abundance and diversity of wild bees (hymenoptera:apoidea) Found in Lowbush Blueberry Growing Regions of Downear Maine. *Environmental Entomology*, 44(4), 975-989.
- Callegari-Jacques, S.M. (Ed.) (2003). *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed
- Chinery, M. (1984). A field guide to the insects of britain and northern Europe. William Collins Sons & Co. Ltd., London.
- Chipps, B.E., Valentine, M.D., Kagey-Sobotka, A., Schuberth, K.C. & Lichtenstein, L.M. (1980). Diagnosis and treatment of anaphylactic reactions to hymenoptera stings in children. *Journal of Pediatrics*, 97, 177-184.

- Cifuentes, C., Vosseler, S., Blank, S., Seismann, H., Pennino, D., Darsow, U., Bredehorst, R., Ring, J., Mempel, M., Spillner, E. & Ollert, M.W. (2014). Identification of hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to venom extract by using recombinant allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(3), 909-910.
- Cingi, C., Ural, K., Acar, A. & Uzlu, E. (2010). Efficacy of mepyramina maleate treatment in dogs with angioedema. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(3), 549-550.
- Cook, C.P., Scott, D.W., Miller, W.H., Kirker, J.E. & Cobb, S.M. (2004). Treatment of canine atopic dermatitis with cetirizine, a second generation antihistamine: A single-blinded, Placebo-controlled study. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(5), 414-417.
- Cox, L., Nelson, H., Lockey, R., Calabria, C., Chacko, T. & Finegold, I. (2011). Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1), S1-S55.
- Cowell, A.K., Cowell, R.L., Tyler, R.D. & Nieves, M.A. (1991). Severe systemic reactions to hymenoptera stings in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(6), 1014-1016.
- Cowell, A.K. & Cowell, R.L. (1995). Management of bee and other Hymenoptera stings, in J.D. Bonagura & R.W. Kirk (Eds.), *Kirk's Veterinary Therapy XII: Small Animal Practice*. (226-228). Philadelphia, WB Saunders.
- David, B.K. & Golden, M.D. (2003). Stinging insect allergy. *American Family Physician*, 67(12), 2541-2546.
- de Haro, L., Labadie, M., Chanseau, P., Cabot, C., Blanc-Brisset, I. & Penouil, F. (2010). Medical consequences of the asian black hornet (*Vespa velutina*) invasion in Southwestern France. *Toxicon*, 55(2-3), 650-652.
- de la Torre-Morin, F., García-Robaina, J.C., Vázquez-Moncholi, C., Fierro, J. & Bonnet-Moreno, C. (1995). Epidemiology of allergic reactions in beekeepers: a lower prevalence in subjects with more than 5 years exposure. *Allergologia et Immunopathologia*, 23, 127-132.
- Dhupa, N. (2005). Management of anaphylactic shock. In North American Veterinary Conference (Eds.), *Proceedings of North American Veterinary Conference, January 8-12, 2005, Orlando, Florida*, Small Animal Care, pp. 157. IVIS Publication, Ithaca, New York.
- Eberlein, B., Suárez, I.L., Darsow, U., Rueff, F., Behrendt, H. & Ring, J. (2010). A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clinical & Experimental Allergy*, 40(3), 411-418.
- Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Schierwegh, A.J., Beirens, L.M.N., Bridts, C.H., Clerck, L.S. & Stevens, W.J. (2007). Flow-assisted quantification of *in vitro* activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Clinical Cytometry*, 72B, 196-203.
- Fernández, J. (2004). Distribution of vespidae species in Europe. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4(4), 319-324.

- Fernandez, J., Sorianow, V., Mayorgaz, L. & Mayor, M. (2005) Natural history of hymenoptera venom allergy in eastern Spain. *Clinical & Experimental Allergy*, 35(2), 179-185.
- Frazier, C.A. (1976). Anaphylactic response to insect sting. *Comprehensive Therapy*, 2(3), 67-73.
- Fritzgerald, K.T. & Flood, A.A. (2006). Hymenoptera stings. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21(4), 194-204.
- Fritzgerald, K.T. (2013). Insects-hymenoptera, in Peterson, M.E. & Talcott, P.A. (Eds.). *Small Animal Toxicology* (3rd ed.). (pp.574-588). St.Louis, Missouri, Elsevier Saunders.
- Fowler, F.J. (1995). Improve survey questions: design and evaluation. *Applied Social Research Methods Series Volume 38*. Thousand Oaks, CA: SAGE Publications.
- Gelincik, A., Issever, H., Unal, D., Isik, E., Demirturk, M., Gul, H., Iliaz, R., Kara, E., Ertek, B., Ozseker, F., Çolakoglu, B. & Buyukozturk, S. (2015). The prevalence of hymenoptere venom allergy in adults: The results of a very crowded city euroasia. *Allergy international*, 64(1), 35-40.
- Gell, P.G.H. & Coombs, R.A.A. (1963). Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease, in P.G.H. Gell & R.R.A. Coombs (Eds.). *Clinical Aspects of Immunology*, Oxford, Blackwell.
- Goldberg, A. & Confino-Cohen, R. (1997). Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100, 182-184.
- Golden, D.B.K., Addison, B., Gadde, J., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M.D. & Lichtenstein, L.M. (1989). Prospective observations on stopping prolonged venom immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 84, 162-167.
- Golden, D.B.K., Marsh, D.G., Freidhoff, L.R., Kwitrovich, K.A., Addison, B., Kagey-Sobotka, A. & Lichtenstein, L.M. (1997). Natural history of hymenoptera venom sensitivity in adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100, 760-766.
- Golden, D.B., Kagey-Sobotka, A. & Lichtenstein, L.M. (2000). Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 27(2), 261-267.
- Golden, D.B. (2007). Insect sting anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105, 385-390.
- Golden, D.B.K., Moffitt, J., Nicklas, R.A., Freeman, T., Graft, D.F., Reisman, R.E. & Tracey, J.M. (2011). Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update 2011. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(4), 852-864.
- Hall, K. (2009). Toxin Exposure, in J.D. Bonagura & D.C. Twedt (Eds.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. (pp.95-96). St. Louis, Missouri, USA, Elsevier Saunders.
- Hahn, I. & Lewin, N.A. (2002). Arthropods. In L.R. Goldfrank, N.E. Flomenbaum, N.A. Lewin, et al. (eds.). *Goldfrank's Toxicologic Emergencies* (7th Ed.), New York: McGraw-Hill.

- Hemmer, W., Focke, M., Kolarich, D., Dalik, I., Gotz, M., Jarisch, R. (2001). Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honey-bee and yellow jacket venom in patients with stinging insect allergy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 1045-1052.
- Hemmer, W. (2008). Cross-reactivity to honeybee and wasp venom. *Der Hautarzt*, 59(3), 194-199.
- Hill, P. (2014). Canine urticarial and angioedema, in C. Noli, A. Foster & R. Wayne (Eds.), *Veterinary Allergy*. (pp.195-200). Chichester, West Sussex, UK, Wiley Blackwell.
- Hillier, A. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary immunology and immunopathology*, 82(3-4), 289-304.
- Hoffman, D.R. (1993). Allergens in hymenoptera venom. XXV: the amino acid sequence of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 92, 707-716.
- Hoffman, D.R. & Jacobson, R.S. (1996). Allergens in hymenoptera venom. XXVII: Bumblebee venom allergy and allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97, 812-821.
- Hoffman, D.R. (2006). Hymenoptera venom allergens. *Allergy and Immunology*, 30(2), 109-128.
- Hofmann, S.C., Pfender, N., Weckesser, S., Huss-Marp, J. & Jakob, T. (2011). Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with hymenoptera venom allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1), 265-267.
- Hunt, K.J., Valentine, M.D., Sobotka, A.K., Benton, A.W., Amodio, F.J. & Lichtenstein, L.M. (1978). A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *The New England Journal of Medicine*, 299, 157-161.
- Incorvaia, C., Pucci, S. & Pastorello, E.A. (1999). Clinical aspects of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 54, 50-52.
- Jackson, H.A. & Müller, R.S (2012). Atopic dermatitis and adverse food reactions, in H.A. Jackson & R. Marsella, *BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology* (3rd ed.) (pp. 130-141). Gloucester, British Small Animal Veterinary Association.
- Jaeger, K., Linek, M., Power, H.T., Bettenay, S.V., Zabel, S., Rosychuk, R.A.W. & Müller, R.S. (2010). Breed and site predisposition of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology*, 21, 119-123.
- Jeep, S., Kircholf, E., O'Connor, A. & Kunkel, G. (1992). Comparison of phadebas RAST with the Pharmacia CAP system for insect venom. *Allergy*, 47, 212-217.
- Jin, C., Focke, M., Kolarich, D., Wilson, I.B., Altmann, F. & Hemmer, W. (2010). Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 184-190.

- King, T.P. Lu, G., Gonzales, M., Qian, N. & Soldatova, L. (1996). Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase. Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98, 588-600.
- Kishiyama, J.L., Tevrizian, A.T. & Ávila, P. (2001). Drug allergy, in: T.G. Parslow, D.P. Stites, A.I. Terr & J.B. Imboden (Eds.), *Medical Immunology* (10th ed.). (pp. 294-400). New York, McGraw Hill.
- Krishna, M.T., Ewan, P.W., Diwakar, L., Durham, S.R., Frew, A.J., Leech, S.C. & Nasser, S.M. (2011). Diagnosis and management of hymenoptera venom allergy: british society for allergy and clinical immunology (BSACI) guidelines. *Clinical & Experimental Allergy*, 41, 1201-1220.
- Krombach, J.W., Kampe, S., Keller, C.A. & Wright, P.M. (2004). Pharaoh Menes' death after an anaphylactic reaction - the end of a myth. *Allergy*, 59, 1234 -1235.
- Lang, R. & Hawranek, T. (2006). Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(4), 224-231.
- Leite, N.B., Aufderhorst-Roberts, A., Palma, M.S., Connell, S.D., Neto, J.R. & Beales, P.A. (2015). PE and PS lipids synergistically enhance membrane poration by a peptide with anticancer properties. *Biophysical Journal*, 109(5), 936-947.
- Lerch, E. & Müller, U.R. (1998). Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-sting in 200 patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(5), 606-612.
- Lichtenstein, L.M., Valentine, M.D. & Sototka, A.K. (1979). Insect allergy: the state of the art. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 64, 5-12.
- Lockey, R.F., Turkeltaub, P.C., Baird-Warren, I.A., Olive, C.A., Olive, E.S., Peppe, B.C. & Bukantz, S.C. (1988). The Hymenoptera venom study I, 1979-1982: demographics and history-sting data. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 82, 370-381.
- López, S., González, M. & Goldarazena, A. (2011). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (hymenoptera: vespidae): first records in iberian peninsula. *Bulletin OEPP/EPPO*, 41, 439-441.
- Loveness, M.H. (1956). Wasp venom allergy and immunity. *Annals of Allergy*, 14, 347-366.
- MADRP- Ministério da agricultura do desenvolvimento rural e das pescas (2010). Programa apícola nacional triénio de 2011 a 2013.
- MacDonald, J.M. (2006). Allergen specific immunotherapy for atopy. In North American Veterinary Conference (Eds.), *NAVC Proceedings, 11 January 2006*, IVIS Publication, Ithaca, New York.
- Maly, F.E., Marti-Wyss, S., Blumer, S., Cuhat-Stark, I. & Wüthrich, B. (1997). Mononuclear blood cell sulfidoleukotriene generation in the presence of interleukin-3 and whole blood histamine release in honey bee and yellow jacket venom allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 7, 217-224.
- Markovic-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P.J., Müller, U. & Schirmer, T. (2000). Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure*, 8(10), 1025-1035.

- Martins, A.M.L. (2010). *Contribuição para o estudo da dermatite atópica canina na área metropolitana de Lisboa*. Dissertação de doutoramento em Clínica. Lisboa:Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Matias, D.F. (2015). *Avaliação de uma nova técnica em alergologia veterinária: testes cutâneos por picada em cães*. Dissertação de mestrado em Clínica. Lisboa:Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Mingomataj, E., Ohri, D., Dhimitri, V., Priftanji, A., Qirko, E., Pani, L., Fischer, T.C., Dinh, Q.T., Peiser, C., Fischer, A., Groneberg, D.A. (2003). Hymenoptera sting anaphylactic reactions in the mediterranean population of Albania. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 13, 272-277.
- Miller, W.H., Griffin, C.E. & Campbell, K.L. (2013). Insect and arachnid hypersensitivity and bites. *Müller & Kirk's: Small Animal Dermatology* (7th ed.). (pp. 414-415). St.Louis, Missouri, Elsevier Saunders.
- Monsalve, R.I., Lu, G. & King, T.P. (1999). Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellow jacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expression and Purification*, 16(3), 410-416.
- Mosbech, H., Christensen, J., Dirksen, A. & Söborg, M. (1986). Insect allergy. Predictive value of diagnostic tests: a three-year follow-up study. *Clinical Allergy*, 18, 71-78.
- Mota, I., Pereira, A.M., Pereira, C., Tomaz, E., Ferreira, M.B., Sabino, F., Coelho, A., Santos, A., Martins, H. & Morais-Almeida, M. (2015). Abordagem e registo da anafilaxia em Portugal. *Acta Médica Portuguesa* 28(6), 786-796.
- Mughal, M.N., Abbas, G., Saqib, M. & Muhammad, G. (2014). Massive attack by honeybees in a German shepherd dog: description of a fatal case and review of the literature. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20(1), 55.
- Müller, H.L. (1966). Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *Journal of Asthma Research*, 3, 331-333.
- Müller, R.S. (2015). Evidence based review of veterinary allergen immunotherapy. In *28th Annual Congress of the European society and College of Veterinary Dermatology - Proceedings Book*. Krakow, Poland, 24-26 September, pp. 100-103.
- Müller, R.S, Janda, J., Jensen-Jarolim, E., Rhyner, C. & Marti, E. (2016). Allergens in veterinary medicine. *Allergy*, 71, 27-35.
- Müller, U., Thurnheer, U., Patrizzi, R., Spiess, J. & Hoigne, R. (1979). Immunotherapy in bee sting hypersensitivity. Bee venom versus wholebody extract. *Allergy*, 34, 369-378.
- Müller, U. (Ed.) (1990). *Insect Sting Allergy: Clinical Picture, Diagnosis and Treatment*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Müller, U., Berchtold, E. & Helbling, A. (1991). Honeybee venom allergy: results of sting challenge

- 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 87, 702-709.
- Müller, U. (2002). Recombinant venom allergens. *Allergy*, 57, 570-576.
- Müller, U. (2003). Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 3, 299-303).
- Müller, U. & Haeberli, G. (2005). Use of beta-blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(3), 606-610.
- Müller, U., Johansen, N., Petersen, A., Fromberg-Nielsen, J. & Haeberli, G. (2009). Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and vespa venom by estimation of IgE antibodies to species specific major allergens Api m 1 and Ves v 5. *Allergy*, 64, 543-548.
- Müller, U., Schmid-Grendelmeier, P., Hausmann, O. & Helbling, A. (2012). IgE to recombinant allergens Api m1, Ves v1, Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy*, 67, 1069-1073.
- Müller, U. R. & Ring, J. (2015). When can immunotherapy for insect sting allergy be stopped?. *Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*. 3(3), 324-328.
- Navarro, L.A., Peláez, A., de la Torre, F., Burillo, J.M.T., Megías, J. & Martínez, I. (2004). Epidemiological factors on hymenoptera venom allergy in a Spanish adult population. *Journal of Investigation Allergology and Clinical Immunology*, 14(2), 134-141.
- Nittner-Marszalska, M., Liebhart, J., Liebhart, E., Dor, A., Dobek, R., Obojski, A. & Medralla, W. (2004). Prevalence of hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. *Medical Science Monitor*, 10(7), CR324-329.
- Nitter-Marszalska, M. & Chichocka-Jarosz, E. (2015). Insect sting allergy in adults - key messages for clinicians, *Polish Archives of Internal Medicine*. Acedido em Set. 2015 em http://www.pamw.pl/sites/default/files/AOP_15_083_Cichocka-Jarosz_141.pdf
- Niza, M.E., Ferreira, R.L., Coimbra, I.V., Guerreiro, H.M., Félix, N.M., Matos, J.M., de Brito, T.V. & Vilela, C.L. (2012). Effects of pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* contact in dogs: 41 cases (2002-2006). *Zoonoses and Public Health*, 59(1), 35-38.
- Novembre, E., Cianferoni, A., Bernardini, R., Veltroni, M., Ingargiola, A., Lombardi, E. & Vierucci, A. (1998). Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clinical & Experimental Allergy*, 28, 834-838.
- NP 014/2012 (2012). *Norma I da Direção-Geral de Saúde para Anafilaxia: Abordagem Clínica*. Direção-Geral da Saude, Ministério da Saude, Lisboa. Acedido em Fev. 2016, disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulare-normativas/norma-n-0142012-de-16122012-png.aspx>.
- Ober, A.I., MacLean, J.A. & Hannaway, P.J. (2003). Life-threatening anaphylaxis to venom immunotherapy in a patient taking an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 1008-1009.

- Ohmori, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Maesa, S., Masuda, K., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2005a). Suspected allergic reactions after vaccination in 85 dogs in Japan. *Veterinary Record*, 156, 87-88.
- Ohmori, K., Masuda, K., Maesa, S., Kaburagi, Y., Kurata, K., Ohno, K., DeBoer, D.J., Tsujimoto, H. & Sakaguchi, M. (2005b). IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic reactions after vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology*, 104, 249-256.
- Olivry, T., DeBoer, D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Müller, R.S., Nuttall, T. & Prélard, P. (2015). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research*, 11, 210.
- Onbasi, K., Onbasi, O., Eminbeyli, L. & Kaynak, C. (2008). Prevalence and alternative therapy methods for bee and wasp in Van. *Allergy*, 63(2), 246-247.
- Oude Elberink, J.N., van der Heide, S., Guyatt, G.H. & Dubois, A.E. (2009). Immunotherapy improves health-related quality of life of adult patients with dermal reactions following yellow jacket stings. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(6), 883-889.
- Piao, X. & Bernstein, A. (1996). A point mutation in the catalytic domain of c-Kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells. *Blood*, 87, 3117-3123.
- Pordata (2011). *Mapa da densidade populacional segundo os Censos*. Acedido 10 Nov., 2015, disponível em <http://www.pordata.pt/DB/Municipios/Ambiente+de+Consulta/Mapa>
- Przybilla, B., Ring, J. & Wielgosch, J. (1988). Der basophilen-histamin-freisetzungstest als diagnostische methode bei hymenopterengift-allergie. *Hautarzt*, 39, 662-670.
- Przybilla, B. & Ruëff, F. (2010). Hymenoptera venom allergy. *Journal of the German Society of Dermatology*, 8, 114-129.
- Purroy, A.I.T., Joral, A., Gordillo, S.C., Lizarza, S., Bacaicoa, M.T.L. & Vega, M.L. (2013). Alergia a veneno de vespa velutina como alergia emergente: estudo de 8 casos. *Journal of Investigation of Allergology and clinical Immunology*, 23(Supl. 2), 57-91.
- Radermecker, M.F., Leclercq, M.D., Mariz, S.D. & Louis, R.E. (1993). Basophil histamin releasability in patients with Hymenoptera venom allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 101, 283-287.
- Reedy, L.M., Miller, W.H. & Willemse, T. (1997). Urticaria-angioedema-anaphylaxis. *Allergic skin diseases of Dogs and Cats*. (2nd ed.). (pp.29-32). Philadelphia, W.B. Saunders.
- Reimers, A., Hari, Y. & Müller, U. (2000). Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadine: a double-blind, placebo controlled trial. *Allergy*, 55(5), 483-487.
- Reisman, R.E. (1994). Insect sting. *New England Journal of Medicine*, 321, 523.

- Reisman, R.E. (2012). Allergy to stinging insects, in L. C. Grammer & P.A. Greenberger (7th eds.), *Paterson's Allergic Disease* (pp. 220-231). Lippincott Williams & Wilkins.
- Rodrigues, A. & Ribeiro, J. (2013). Alergia a veneno de himenópteros. *Revista de saúde Amato Lusitano*, 32, 19-24.
- Ruëff, F., Przybilla, B., Biló, M.B., Müller, U., Scheipl, F., Aberer, W., Birnbaum, J., Bodzenta-Lukaszyk, A., Bonifazi, F., Bucher, C., Campi, P., Darsow, U., Egger, C., Hawranek, T., Körner, M., Kucharewicz, I., Küchenhoff, H., Lang, R., Quercia, O., Reider, N., Severino, M., Sticherling, M., Sturm, G.J. & Wüthrich, B. (2009). Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase – a study of the European academy of allergology and clinical immunology interest group of insect venom hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129, 1047–1054.
- Sainte-Laudy, J., Sabbah, A., Drouet, M., Lauret, M.G. & Loiry, M. (2000). Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clinical & Experimental Allergy* 30, 1166-1171.
- Sánchez, J.O. (2013). Mapa de distribución de vespídos. *Journal of Investigation of Allergology and clinical Immunology*, 23(Supl. 2), 47-49.
- Savi, E., Peveri, S., Makri, E., Pravettoni, V. & Incorvaia, C. (2016). Comparing the ability of molecular diagnosis and CAP-inhibition in identifying the really causative venom in patients with positive tests to vespula and polistes species. *Clinical and Molecular Allergy*, 14(3).
- Schaer, M., Buckley, G.J., Conner, B.J., Cuddy, L.C., Vigani, A., Vansickle, A.E., Coisman, J.G., DeVuyst, D.R. & Bandt C. (2015). Severe pit viper envenomation with extended clinical signs and treatment complications in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 51(5), 329-337.
- Schmidt, J.O. & Hassen, L.V.B. (1996). When africanized bees attack: what you and your clients should know. *Veterinary Medicine*, 91(10), 923-928.
- Scott, D.W., Miller, W.H. & Griffin, C.E. (2001). Skin immune system and allergic skin disease. *Müller & Kirk's: Small Animal Dermatology* (6th ed.). (pp. 573-601). Philadelphia, Elsevier Saunders.
- Shmuel, D.L. & Cortes, Y. (2013). Anaphylaxis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23(4), 377-394.
- Spillner, E., Blank, S. & Jakob, T. (2014). Hymenoptera allergens: from venom to “venome”. *Frontiers in Immunology*, 5, 77.
- Sponsler, D.B. & Johnson, R.M. (2015). Honey bee success predicted by landscape composition in Ohio, USA. *PeerJ*, 3, Article 838, Disponível em <https://dx.doi.org/10.7717/peerj.838>
- Stapel, S.O., Wanders-Lijster de Raadt, J., van Toorenenbergen, A.W. & de Groot, H. (1998). Allergy to bumblebee venom. IgE cross-reactivity between bumblebee and honeybee venom. *Allergy*, 53, 769-777.

- Starling, M.J., Branson, N., Thomson, P.C. & McGreevy, P.D. (2013), Age, sex and reproductive status affect boldness in dogs. *The Veterinary Journal*, 197(3), 868-872.
- Steen, J.B., Mohus, I., Kvesetberg, T. & Walløe, L. (1996). Olfaction in bird dogs during hunting. *Acta Physiologica Scandinavica*, 157(1), 115-119.
- Stoevesandt, J., Hain, J., Stolze, I., Kerstan, A. & Trautmann, A. (2014). Angiotensin-converting enzyme inhibitors do not impair the safety of hymenoptera venom immunotherapy build-up phase. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(5), 747-755.
- Stohmeier, B., Aberer, W., Bokanovic, D., Komericki, P. & Sturm, G.J. (2013). Simultaneous intradermal testing with hymenoptera venoms is safe and more eficiente than sequential testing. *Allergy*, 68, 542-544.
- Sturm, G., Kränke, B., Rudolph, C. & Aberer, W. (2002). Rush hymenoptera venom immunotherapy: a safe and practical protocolo for high-risk patients. *Journal of Allergy and clinical immunology*, 110 (6), 928-933.
- Sturm, G., Jin, C., Kranzelbinder, B., Hemmer, W., Sturm, E.M., Griesbacher, A., Heinemann, A., Vollmann, J., Altmann, F., Crailsheim, K., Focke, M. & Aberer, W. (2011). Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One*, 6(6), e20842.
- Tavares, B. (2005). Alergia a veneno de himenópteros – novos métodos de diagnóstico. *Acta Médica Portuguesa*, 18, 445-452.
- TFS- Thermo Fisher Scientific (2012). *Princípio de Teste IgE Específica ImmunoCap*. Acedido em Mai. 20, 2015, disponível em: <http://www.phadia.com/pt-PT/5/Products/Ensaios/1/Principio-de-Teste-IgE-Especific-ImmunoCAP/>
- Tizard, I.R. (2013a). Type I hypersensitivity, in I.R. Tizard (Ed.), *Veterinary Immunology*: (9th ed.). (pp.326-345), St.Louis, Missouri, Elsevier Saunders.
- Tizard, I.R. (2013b). Red cell antigens and type II hypersensitivity, in I.R. Tizard (Ed.), *Veterinary Immunology*: (9th ed.). (pp.345-354), St.Louis, Missouri, Elsevier Saunders.
- Tizard, I.R. (2013c). Immune complexes and type III hypersensitivity, in I.R. Tizard, (Ed.), *Veterinary Immunology*: (9th ed.). (pp.355-364), St.Louis, Missouri, Elsevier Saunders.
- Tizard, I.R. (2013d). Type IV hypersensitivity: Delayed Hypersensitivity, in I.R. Tizard (Ed.), *Veterinary Immunology* (9th ed.). (pp.365-375), St.Louis, Missouri, Elsevier Saunders.
- Tomé, S., Reis, G., Guedes, M., Saraiva, L. & Teixeira, F. (2009). Imunoterapia com veneno de himenópteros: a experiencia de uma consulta. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 40(1), 30-32.
- Toogood, J.H. (1987). Beta-blocker therapy and the risk of anaphylaxis. *Canadian Medical Association Journal*, 136(9), 929-933.

- Urbanek, R., Forster, J., Kuhn, W. & Ziupa, J. (1985). Discontinuation of bee venom immunotherapy in children and adolescents. *Journal of Pediatrics*, 107, 365-371.
- van der Linden, P.W., Hack, C.E., Struyvenberg, A., van der Zwan, J.K. (1994). Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 94, 151-159.
- van Halteren, H.K., van der Linden, P.W., Burgers, J.A. & Bartelink, A.K. (1997). Discontinuation of yellow jacket venom immunotherapy: follow-up of 75 patients by means of deliberate sting challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100, 767-770.
- Vilas-Boas, M. (2007). Tratamentos alternativos: desenvolvimento da apicultura biológica em Trás-os-Montes e Alto Douro. *O Segredo da Terra*, ISSN 1645-5819, 19, 18-20.
- Waddell, S.L. & Drobatz, K.J. (1999). Massive envenomation by vespula spp. in two dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 9(2), 67-71.
- White, K.M. & England, R.W. (2008). Safety of angiotensin-converting enzyme inhibitors while receiving venom immunotherapy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 101, 426-430.
- Wood, R.A, Segall, N., Ahlstedt, S. & Williams, P.B. (2007). Accuracy of IgE antibody laboratory results. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 99(1), 34-41.
- Wysoke, J.M., van-den Berg, P.B. & Marshall, C. (1990). Bee sting-induced haemolysis, spherocytosis and neural dysfunction in three dogs. *Journal of the South Africa Veterinary Association*, 61(1), 29-32.
- Zollner, T.M., Spengler, K., Podda, M., Ergezinger, K., Kaufmann, R. & Boehncke, W.H. (2001). The Western blot is a highly sensitive and efficient technique in diagnosing allergy to wasp venom. *Clinical & Experimental Allergy*, 31, 1754-1761.

Anexo I - Inquérito às clínicas veterinárias

Alergia à picada de himenópteros em cães

FMV-ULisboa - Questionário para Clínicas Veterinárias.

***Obrigatório**

Por ano, quantos casos de cães alérgicos por picada de himenópteros surgem no veterinário? *

- ☐ 1 a 3 casos por ano
- ☐ 4 a 5 casos por ano
- ☐ 6 a 7 casos por ano
- ☐ 8 a 9 casos por ano
- ☐ 10 a 19 casos por ano
- ☐ 20 a 30 casos por ano
- ☐ > 30 casos por ano

Número exato (se existir informação)

Em que estação do ano ocorrem a maioria dos casos? *

- ☐ Inverno
- ☐ Primavera
- ☐ Verão
- ☐ Outono

Os donos parecem saber com certeza qual o tipo de agente ("abelha") envolvida? *

- ☐ Sim
- ☐ Não

Se sim, qual é mais frequente?

- ☐ Abelha
- ☐ Vespa
- ☐ Zangão

Quais são os sintomas que já teve na clínica devido à picada de himenópteros? *

- ☐ Eritema
- ☐ Dor
- ☐ Angioedema
- ☐ Urticaria
- ☐ Diarreia ou vômitos
- ☐ Dispneia
- ☐ Colapso
- ☐ Incontinência
- ☐ Cianose
- ☐ Morte
- ☐ Outra:

Quais são os sintomas mais frequentes? *

- ☐ Eritema
- ☐ Dor
- ☐ Angioedema
- ☐ Urticaria
- ☐ Diarreia ou vômitos
- ☐ Dispneia
- ☐ Colapso
- ☐ Incontinência
- ☐ Cianose
- ☐ Morte
- ☐ Outra:

Qual a região mais frequentemente da picada? *

- ☐ Face
- ☐ Patas
- ☐ Dorso
- ☐ Abdomen
- ☐ Múltiplas
- ☐ Outra:

Quais os tratamentos mais utilizados? *

- ☐ Antihistamínicos
- ☐ Córnicos
- ☐ Epinefrina
- ☐ Fluidoterapia
- ☐ Oxigenioterapia
- ☐ Frio
- ☐ Imunoterapia
- ☐ Outra:

Adequa o tratamento á gravidade da problema? *

- ☐ Sim
- ☐ Nao

São dados alguns conselhos aos donos para prevenir o problema? *

- ☐ Sim
- ☐ Nao

Se sim, quais?

Qual o estilo de vida do cão na maioria dos casos? *

- ☐ Exterior
- ☐ Interior mas com acesso ao Exterior
- ☐ Interior

Considera que existe alguma raça mais predisposta? *

- ☐ Sim
- ☐ Nao

Se sim, Qual?

Qual a idade em que ocorrem mais frequentemente estes casos? *

- ☐ Cachorro
- ☐ Adulto jovem
- ☐ Adulto
- ☐ Velho
- ☐ Indiferente

Sabe se existem apicultores na região?

- ☐ Sim
- ☐ Não

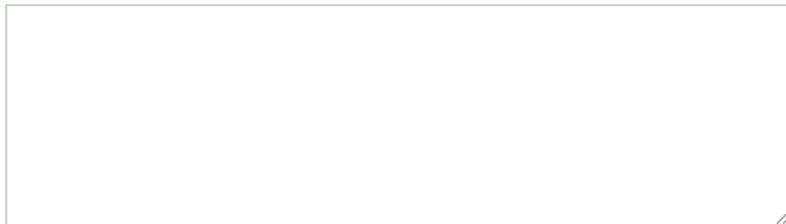
Alguma vez teve algum caso de um apicultor com cão a procurar o veterinário por este problema? *

- ☐ Sim
- ☐ Nao

Considera as picadas de abelhas um assunto importante em veterinária?

- ☐ Sim
- ☐ Nao

Local da clínica *

A large, empty rectangular text box with a thin black border, intended for the user to enter the location of the clinic. A small cursor icon is visible in the bottom right corner of the box.

Anexo II - Distribuição do número de apiários, colmeias, cortiços e colónias por distrito/ concelho (resumo dos dados disponibilizados pela DGAV)

DICO	Apiários	Colmeias	Colónias	Cortiços	Distrito
0101	24	156	161	8	Aveiro
0102	7	93	93	0	Aveiro
0103	66	515	539	40	Aveiro
0104	31	536	577	75	Aveiro
0105	12	149	162	25	Aveiro
0106	26	334	347	19	Aveiro
0107	2	13	13	0	Aveiro
0108	16	204	204	0	Aveiro
0109	29	514	552	73	Aveiro
0111	58	619	659	76	Aveiro
0112	2	38	38	0	Aveiro
0113	34	574	601	51	Aveiro
0114	24	179	180	1	Aveiro
0115	18	367	380	25	Aveiro
0116	1	10	10	0	Aveiro
0117	18	166	178	20	Aveiro
0118	14	173	173	0	Aveiro
0119	55	531	559	48	Aveiro
0201	27	853	992	278	Beja
0202	157	3227	3265	67	Beja
0203	4	57	57	0	Beja
0204	4	57	57	0	Beja
0205	29	1030	1080	100	Beja
0206	14	231	232	1	Beja
0207	10	389	391	4	Beja
0208	8	340	340	0	Beja
0209	120	2567	2668	179	Beja
0210	9	177	178	1	Beja
0211	369	8528	8712	354	Beja
0212	267	5884	5930	81	Beja
0213	22	504	504	0	Beja
0214	34	1151	1153	3	Beja
0301	14	173	174	1	Braga
0302	35	478	489	20	Braga
0303	9	104	104	0	Braga
0304	21	409	421	20	Braga
0305	95	1210	1286	132	Braga
0306	3	15	17	2	Braga
0307	22	267	277	18	Braga
0308	22	428	433	10	Braga
0309	22	563	567	7	Braga
0310	81	989	995	10	Braga
0311	59	650	673	43	Braga
0312	41	696	723	50	Braga
0313	25	664	669	9	Braga
0314	2	32	33	2	Braga
0401	73	1755	1757	3	Bragança
0402	250	7455	7467	22	Bragança
0403	86	2930	2933	4	Bragança
0404	8	311	311	0	Bragança
0405	210	4784	4808	43	Bragança
0406	85	1762	1770	12	Bragança
0407	252	5407	5427	37	Bragança
0408	194	4781	4872	174	Bragança
0409	172	4739	4801	104	Bragança
0410	79	1843	1847	6	Bragança
0411	39	1455	1455	0	Bragança
0412	203	4675	4680	7	Bragança
0501	21	322	324	4	C.Branco
0502	425	7148	7450	536	C.Branco
0503	126	1850	2035	347	C.Branco
0504	122	2029	2138	207	C.Branco
0505	116	956	960	8	C.Branco
0506	9	242	246	8	C.Branco
0507	149	1933	2026	170	C.Branco

0508	57	189	323	244	C.Branco
0509	77	547	642	170	C.Branco
0510	165	1069	1218	264	C.Branco
0511	159	1650	1705	95	C.Branco
0601	32	430	473	83	Coimbra
0602	74	750	764	26	Coimbra
0603	32	438	442	6	Coimbra
0604	19	172	172	0	Coimbra
0605	17	162	170	15	Coimbra
0606	43	478	646	324	Coimbra
0607	8	299	300	1	Coimbra
0608	15	279	295	29	Coimbra
0609	35	420	426	10	Coimbra
0610	41	361	395	62	Coimbra
0611	19	241	241	0	Coimbra
0612	85	1068	1309	452	Coimbra
0613	65	413	457	72	Coimbra
0614	18	188	205	31	Coimbra
0615	93	836	973	267	Coimbra
0616	20	229	229	0	Coimbra
0617	42	613	653	75	Coimbra
0701	37	895	949	99	Evora
0702	29	504	522	29	Evora
0703	13	280	290	19	Evora
0704	31	889	904	27	Evora
0705	44	1296	1307	19	Evora
0706	71	1003	1059	102	Evora
0707	52	789	828	72	Evora
0708	1	11	12	1	Evora
0709	58	1650	1715	123	Evora
0710	24	837	853	30	Evora
0711	32	958	1018	117	Evora
0712	20	278	287	15	Evora
0713	8	221	221	0	Evora
0714	15	469	480	21	Evora
0801	127	1760	1768	15	Faro
0802	361	4925	5046	206	Faro
0803	203	4144	4146	4	Faro
0804	325	4310	4545	416	Faro
0805	46	588	588	0	Faro
0806	15	358	358	0	Faro
0807	19	339	339	0	Faro
0808	1142	15287	15406	222	Faro
0809	428	7307	7376	135	Faro
0810	43	563	588	46	Faro
0811	197	3561	3563	3	Faro
0812	185	1805	1831	46	Faro
0813	1125	17229	17386	289	Faro
0814	543	7099	7283	324	Faro
0815	41	685	732	92	Faro
0816	20	259	284	48	Faro
0901	39	321	324	6	Guarda
0902	56	1469	1490	42	Guarda
0903	39	619	620	2	Guarda
0904	12	342	356	26	Guarda
0905	18	157	162	9	Guarda
0906	14	108	109	2	Guarda
0907	102	2005	2017	18	Guarda
0908	21	289	296	11	Guarda
0909	17	314	322	15	Guarda
0910	37	715	715	0	Guarda
0911	172	4699	4861	314	Guarda
0912	43	899	903	8	Guarda
0913	30	532	533	2	Guarda
0914	64	1777	1789	19	Guarda
1001	51	454	479	42	Leiria
1002	38	305	305	0	Leiria
1003	80	468	480	18	Leiria
1004	48	658	699	81	Leiria
1005	6	94	94	0	Leiria
1006	34	322	329	12	Leiria
1008	19	156	162	11	Leiria
1009	84	888	955	128	Leiria
1010	14	224	227	4	Leiria
1011	5	30	31	1	Leiria

1012	5	69	69	0	Leiria
1013	31	462	478	27	Leiria
1014	5	88	88	0	Leiria
1015	146	1484	1496	21	Leiria
1016	51	808	824	28	Leiria
1101	2	51	51	0	Lisboa
1102	4	29	29	0	Lisboa
1103	9	285	298	26	Lisboa
1104	9	58	65	11	Lisboa
1105	7	145	156	22	Lisboa
1106	3	35	35	0	Lisboa
1107	9	49	49	0	Lisboa
1108	3	31	31	0	Lisboa
1109	9	180	186	10	Lisboa
1111	10	120	124	6	Lisboa
1112	12	272	272	0	Lisboa
1113	11	213	229	28	Lisboa
1114	3	31	33	3	Lisboa
1116	3	31	61	57	Lisboa
1201	22	499	519	34	Portalegre
1202	32	980	989	18	Portalegre
1203	38	500	561	117	Portalegre
1204	3	102	102	0	Portalegre
1205	8	90	95	6	Portalegre
1206	14	264	277	25	Portalegre
1207	12	441	444	5	Portalegre
1208	47	962	994	58	Portalegre
1209	63	928	996	126	Portalegre
1210	27	370	409	70	Portalegre
1211	38	810	847	68	Portalegre
1212	62	810	818	10	Portalegre
1213	197	1956	2133	323	Portalegre
1214	39	751	791	76	Portalegre
1215	26	630	640	17	Portalegre
1301	122	1123	1164	66	Porto
1302	6	123	123	0	Porto
1303	12	117	125	13	Porto
1304	3	20	20	0	Porto
1305	3	79	79	0	Porto
1306	6	77	79	4	Porto
1307	20	226	227	2	Porto
1309	24	353	368	22	Porto
1310	36	569	603	54	Porto
1311	56	749	783	59	Porto
1312	1	4	4	0	Porto
1313	6	28	28	0	Porto
1314	19	329	332	6	Porto
1315	8	126	130	6	Porto
1316	13	161	169	15	Porto
1317	3	64	77	26	Porto
1318	2	60	60	0	Porto
1401	42	823	921	187	Santarem
1402	49	760	793	57	Santarem
1403	22	495	505	18	Santarem
1404	6	63	67	7	Santarem
1405	11	270	272	2	Santarem
1406	2	85	93	15	Santarem
1407	13	168	175	14	Santarem
1408	16	394	426	59	Santarem
1409	22	444	468	45	Santarem
1410	2	39	39	0	Santarem
1411	23	246	254	13	Santarem
1412	2	83	84	2	Santarem
1413	194	1423	1593	281	Santarem
1414	83	1027	1095	120	Santarem
1415	3	19	19	0	Santarem
1416	46	684	710	47	Santarem
1417	27	323	351	50	Santarem
1418	54	760	784	46	Santarem
1419	53	870	910	71	Santarem
1420	6	48	51	6	Santarem
1421	116	1090	1131	71	Santarem
1501	17	263	266	5	Setubal
1502	1	27	27	0	Setubal
1505	56	1071	1094	40	Setubal

1506	3	80	82	4	Setubal
1507	8	78	81	5	Setubal
1508	26	447	459	21	Setubal
1509	32	724	726	3	Setubal
1510	24	428	440	22	Setubal
1511	70	1165	1241	148	Setubal
1512	13	145	150	8	Setubal
1513	43	872	880	13	Setubal
1601	26	807	818	19	Viana do Castelo
1602	40	612	634	42	Viana do Castelo
1603	36	329	347	31	Viana do Castelo
1604	41	436	455	29	Viana do Castelo
1605	14	314	320	9	Viana do Castelo
1606	16	539	549	18	Viana do Castelo
1607	49	464	478	22	Viana do Castelo
1608	22	164	181	30	Viana do Castelo
1609	55	1101	1149	88	Viana do Castelo
1610	54	940	984	82	Viana do Castelo
1701	29	481	489	15	Vila Real
1702	54	2212	2219	10	Vila Real
1703	152	4135	4162	50	Vila Real
1704	7	99	99	0	Vila Real
1705	27	375	409	61	Vila Real
1706	193	7675	7725	90	Vila Real
1707	18	639	650	21	Vila Real
1708	10	149	150	1	Vila Real
1709	13	354	375	40	Vila Real
1710	31	1121	1180	115	Vila Real
1711	7	67	70	6	Vila Real
1712	131	2833	2893	114	Vila Real
1713	87	2013	2045	56	Vila Real
1714	53	1012	1022	17	Vila Real
1801	12	129	133	7	Viseu
1802	8	192	192	0	Viseu
1803	165	2061	2092	52	Viseu
1804	78	1563	1593	54	Viseu
1805	13	166	168	3	Viseu
1806	14	120	120	0	Viseu
1807	25	431	431	0	Viseu
1808	37	418	444	48	Viseu
1809	30	861	862	2	Viseu
1810	41	383	403	32	Viseu
1811	32	373	378	7	Viseu
1812	11	243	243	0	Viseu
1813	6	285	285	0	Viseu
1814	14	171	180	14	Viseu
1815	24	663	673	16	Viseu
1816	130	826	861	51	Viseu
1817	40	421	421	0	Viseu
1818	16	332	333	2	Viseu
1819	13	165	167	3	Viseu
1820	5	37	37	0	Viseu
1821	96	1452	1543	169	Viseu
1822	35	524	544	34	Viseu
1823	136	1673	1696	37	Viseu
1824	90	692	766	134	Viseu

Anexo III - Termo de aceitação para participação no estudo.



U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Autorização para participação em estudo

Eu, abaixo assinado, declaro que tomei conhecimento e autorizo o meu canídeo de nome _____ a participar no estudo “Alergia à picada de himenópteros em cães” após ter sido devidamente informado sobre todo o procedimento.

Por ser verdade,

Lisboa, _____ de _____ de 2016.

Anexo IV - Inquérito aos proprietários de cães picados por himenópteros

Cães picados por abelhas

Questionário para donos de cães que foram picados por abelhas

*Obrigatório

O seu cão têm algum tipo de alergia que conheça (excepto às abelhas/vespas)? *

- ☐ Sim
- ☐ Não

Quantas vezes foi picado por abelhas ao longo da vida? *

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ 4
- ☐ +5

A reação foi? *

- ☐ Local (Vermelhidão e/ou inchaço até <5 cm apenas num local do corpo)
- ☐ Sistémica (Inchaço >5 cm e/ou outros sinais como desmaios, dificuldade em respirar, convulsões)

Sabe quem foi o agente culpado? *

- ☐ sim
- ☐ não

Se sim, qual destes?

- ☐ Abelha de mel
- ☐ Vespa
- ☐ Zangão
- ☐ Poliste
- ☐ Outra:

Foi ao veterinário de urgência? *

- ☐ sim
☐ não

A quantos km fica o veterinário mais próximo do local do incidente? *

- ☐ 5 km
☐ 10 km
☐ 20 km
☐ >20 km

Onde estava o seu cão quando foi picado? *

- ☐ Casa
☐ Jardim público
☐ Praia
☐ Campo
☐ Outra:

Onde habita o seu cão? *

- ☐ Apartamento
☐ Casa com jardim
☐ Outra:

Qual o grau de preocupação quando foi picado pela primeira vez? *

1 2 3 4 5

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

E nas vezes seguintes?

1 2 3 4 5

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Que medicação foi usada para tratar este problema? *

- ☐ Adrenalina
☐ Córdicos
☐ Anti-histamínico
☐ Fluidos ± Oxigénio
☐ Outra:

Tem consigo alguma injeção de epinefrina ou outro tipo de medicação para usar no seu cão, em situações de urgência? *

- ☐ sim
☐ não

Quais foram os conselhos dados pelo veterinário para evitar este problema? *

Nome *

Idade *

Raça *

O